ZUR WERTBEMESSUNG DER ANTIDYSENTERIESERA

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT

VON

RALPH ZANGGER

VON ZÜRICH

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER IN BERLIN. 1923

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag
von Herrn Professor R. Doerr

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die vorliegende Arbeit erscheint unter gleichem Titel
in der Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Band 101

Eine einheitliche, theoretisch gut begründete und den praktischen Bedürfnissen der Serotherapie entsprechende Regelung der Wertbemessung der Dysenterieheilsera stellt — wie *Doerr* an anderer Stelle auseinandergesetzt hat — ein sehr kompliziertes und nur durch langwierige, systematische Arbeit lösbares Problem dar.

Die Schwierigkeiten der Aufgabe sind größtenteils darauf zurückzuführen, daß die „Bacillenruhr" nach den herrschenden Auffassungen durch eine große Anzahl *verschiedener* Stäbchen der Typhus-Coli-Gruppe hervorgerufen werden kann, die sich durch ihre Antigenfunktionen sowie durch ihre Tierpathogenität voneinander unterscheiden. *Doerr* machte allerdings schon im Jahre 1905 den Vorschlag, die bakteriellen Dysenterieerreger in zwei Gruppen einzuordnen, die für das Kaninchen spezifisch giftigen *Shiga-Kruse-Stämme* und die *atoxischen Rassen*, von denen damals der „Typus Flexner" am besten bekannt war, und diese Einteilung, die sich ja auch mit bestimmten Differenzen des Fermentationsvermögens deckte, wurde in der Folgezeit als brauchbar beibehalten. Nur fanden es einzelne Autoren im Anschluß an *Lentz* für angebracht, die Bezeichnung „*atoxisch*" durch „*giftarm*" (*oligotoxisch*) zu ersetzen, eine Abänderung, die insofern nicht gerechtfertigt schien, als sie die Vorstellung erwecken mußte, daß auch diejenigen Rassen, welche nicht dem Shiga-Kruse-Typ angehören, Gifte produzieren, *welche von den Shigatoxinen bloß quantitativ, nicht aber qualitativ abweichen, und die insbesondere kraft einer ausgeprägten Enterotropie zur Pathogenese der Ruhr in enge Beziehung gesetzt werden dürfen.* Davon war aber bei den Typen *Flexner*, *Strong* und bei den von *Hiss* und *Russel* beschriebenen *Y*-Bacillen, den am eingehendsten studierten Repräsentanten der atoxischen Gruppe, keine Rede; durch Injektion großer Dosen lebender oder abgetöteter Bakterien, ab und zu auch durch Einspritzung der Filtrate sehr alter Bouillonkulturen (*Kraus* und *Doerr*) ließen sich zwar bei Kaninchen, Pferden und Ziegen (*Baermann* und *Schüffner*) toxische Effekte erzielen, *die aber keinen spezifisch-dysenterischen Charakter*

aufwiesen und in gleicher Form auch nach Einspritzungen von Typhus-, Paratyphus- oder Coli-Bacillen beobachtet worden waren. Die durch den Ausdruck „*giftarm*" oder gar „*toxinarm*" involvierte Verwischung der scharfen von *Kraus* und *Doerr* gezogenen Grenze entsprach somit wenigstens bis vor kurzem nicht dem in einwandfreien und reproduzierbaren Versuchen festgelegten Bestand der Tatsachen. Erst in jüngster Zeit wurden Befunde veröffentlicht, welche die Existenz echter „*giftarmer*" Typen in dem hier erörterten Sinne (Gift = Dysenterietoxin) zwar nicht außer Zweifel stellen, aber doch bis zu einem gewissen Grade wahrscheinlich machen. Es handelt sich um die Angaben von *Sonne*, *Přibram* und *Thjøtta* und *Sundt*, welche sich auf die Giftigkeit gewisser mannitvergärender Rassen, vor allem des von *Kruse* mit *E* bezeichneten Typus (Gruppe III der Klassifikation von *Thjøtta*) beziehen[1]). Abgesehen davon, daß man die Verbreitung der Infektionen mit solchen Stämmen

[1]) *Sonne* konnte mit einer bestimmten, mannitvergärenden, kein Indol bildenden Art von Dysenteriebacillen bei einem Affen Diarrhöen erzielen, die aber nicht blutig waren; in den Entleerungen des lebenden sowie in den Mesenterialdrüsen und Darmfollikeln des getöteten Tieres fanden sich die verfütterten Bacillen in großen Mengen, ja in Reinkultur. Kaninchen reagierten auf die parenterale Zufuhr der lebenden oder abgetöteten Kulturen mit beträchtlicher Abmagerung und jedenfalls *weit stärker als auf die Stämme Flexner, Strong und Y. — Die Toxizität der Shigastämme erreichten die Sonne*schen *Kulturen jedoch nicht einmal annähernd.* — *Thjøtta* und *Sundt* gewannen mit identischen, in Norwegen gezüchteten Rassen Bouillonkulturfiltrate und Autolysate, welche bei Kaninchen in sehr großen Dosen (2—3 ccm) intravenös injiziert Diarrhöen erzeugten, die bald wieder verschwanden; nur ein kleines Tier (750 g), das 3 ccm intravenös erhalten hatte, bekam profuse blutige Stühle und verendete am 1. Tag. — *Přibram* stellte gleichfalls (schon vor den nordischen Autoren) mit verschiedenen mannitfermentierenden Stämmen (nicht nur mit dem *Kruse*schen Typus E, der den Stämmen von *Sonne* entspricht, sondern auch mit den Typen A, D und H) Bouillonkulturfiltrate her, welche für Kaninchen von 1000 g in Dosen von 0,5 ccm intravenös giftig waren; die Tiere zeigten zum Teil *Paralysen*, magerten rasch ab und gingen meist *protrahiert* (*nach 4—7 Tagen*) ein. Die bei 56° C abgetöteten Agarkulturen töteten intravenös unter ähnlichen Symptomen in Mengen von $^1/_{10}$ bis $^1/_{20}$ Öse; wurden die Injektionen wiederholt, so genügten weit kleinere Mengen, eine Kumulativwirkung, die man auch bei der iterativen Zufuhr von Shigabacillen beobachtet. Die Sektionsbefunde der eingegangenen Kaninchen entsprachen, soweit sich das aus den Angaben von *Přibram* entnehmen läßt, nicht den typischen Bildern der Shigavergiftung; *Ödeme, Blutungen und Nekrosen, die 3 Hauptmerkmale dysenteroider Giftwirkung fehlten anscheinend ganz.* Mit dem Toxin eines D-Stammes gewann *Přibram* ein antitoxisches Ziegenserum, welches das homologe Toxin im Getrenntversuch neutralisierte, während normales Ziegenserum oder Shiga-Antitoxin unwirksam waren; doch genügen die beigebrachten experimentellen Belege nicht für sichere Aussagen. *Přibram* will auf Grund seiner Befunde die Einteilung in „giftbildende" und „giftarme" Typen ganz fallen lassen und nur das Verhalten gegen Mannit als Klassifikationsprinzip verwenden (B. dysent. typus acidificans und B. d. t. von acidificans). Zum Typus acidificans würden die giftarmen Stämme A—H (*Kruse*), ebenso wie die anderen kein *Toxin bildenden Varietäten* (*Flexner, Y*) gehören. Dazu liegt jedoch — wie oben ausgeführt wird — keine Veranlassung

und daher auch ihre Bedeutung für die Serumfabrikation noch nicht abzuschätzen vermag, ist die ganze Angelegenheit zur Zeit keineswegs spruchreif; selbst wenn sie in positivem Sinne entschieden werden sollte, würde man sich zunächst nur genötigt sehen, das von *Doerr* aufgestellte Erregerschema zu erweitern und *zwischen die Stämme mit starker und jene mit fehlender (nicht nachweisbarer) Toxinproduktion jene mit schwacher und vielleicht auch weniger konstanter Bildung dysenterogener Gifte einzuschalten.*

Es fragt sich nur, ob die Antithese giftiger und atoxischer Ruhrbacillen — sei es in der ursprünglichen oder in der modifizierten Fassung — eine ausreichend fundierte *Vereinfachung* für die Herstellung und Wertbestimmung der Dysenterieheilsera bedeutet. Bekanntlich hat man diese Frage in folgender Form bejaht: Man nahm an, daß bei Infektionen mit toxischen Erregern das enterotrope Gift den wesentlichen pathogenen Faktor darstellt, daß man also bei der Gewinnung und Wertbemessung der korrespondierenden Heilsera auf das *Antitoxin* abzustellen habe[1]); auf Infektionen mit Bacillen ohne nachweisbare Giftbildung ließ sich dieser Gedankengang nicht anwenden, und da rückte man — man möchte fast sagen in Ermangelung sicherer Anhaltspunkte — die *antiinfektiösen Eigenschaften* der Sera in den Vordergrund. Es wurde aber wiederholt darauf hingewiesen, daß dieses Vorgehen zu dem einheitlichen Krankheitsbild der Ruhr in Gegensatz steht, dem man nicht ohne Willkür bald einen mehr toxischen, bald einen rein infektiösen Charakter zuschreiben kann; daß die Shigainfektionen im allgemeinen

---

vor; auch dient eine Einteilung, welche auf die Fermentation der Kohlenhydrate aufgebaut ist, nur mehr der Diagnostik und verzichtet auf die medizinisch, speziell serotherapeutisch wichtige Beziehung zur Pathogenität der einzuteilenden Mikroorganismen.

[1]) *Pfeiffer* und *Ungermann* stellen antitoxische Wirkungen der Dysenteriesera ganz in Abrede und wollen bloß *antiinfektiöse* gelten lassen (die Kritik ihrer experimentellen Beweise findet man bei *Bächer* und *Laub, Doerr* u. a.). Einen ähnlichen Standpunkt vertritt *Kruse*, der ebenso wie *Pfeiffer* und *Ungermann* im Shigatoxin nur ein „*Kaninchengift*" sieht, welches in der Pathogenese der Ruhr beim Menschen keine Rolle spielt. Denn auch die im Tierexperiment ungiftigen Bacillentypen können schwere Erkrankungen hervorrufen, die sich klinisch und anatomisch in keiner Weise von den durch die tierpathogenen Shigastämme erzeugten unterscheiden. Die kurativen Effekte, welche die am Kaninchen antitoxisch wirkenden Dysenteriesera nach den Angaben der meisten Beobachter beim ruhrkranken Menschen entfalten, will *Kruse* nicht als Gegenargument anerkennen, da solche Sera außer den Antitoxinen des „Kaninchengiftes" noch andere Schutzkörper (Bakteriolysine, Tropine usw.) enthalten; diese leisten aber nach *Kruse* die Hauptarbeit, indem sie das Wachstum der Ruhrbacillen im Gewebe der Darmwand hemmen. Wenn sich am Heilungsprozeß antitoxische, d. h. entgiftende Kräfte beteiligen, so seien es nicht die im Experiment nachweisbaren, sondern solche, welche die bei allen Ruhrbacillen vorhandenen Endotoxine unschädlich machen, vielleicht auf fermentativem Wege.

schwerer verlaufen, kann nur als *graduelle*, nicht aber als eine die Einteilung der Erreger widerspiegelnde *prinzipielle* Differenz gewertet werden und trifft übrigens durchaus nicht immer zu, wie die Erfahrungen des Weltkrieges lehrten (*Ernst*, *Falta* und *Kohn* u. a. m.). Obzwar wir den Mechanismus der Ruhrerkrankung nicht genau kennen und nicht sicher wissen, *wie die Anwesenheit der Dysenteriebacillen mit den pathologisch-anatomischen Veränderungen im Darme zusammenhängt*[1]), sprechen doch verschiedene Momente und Analogien dafür, daß in allen Fällen Giftwirkungen die Hauptrolle spielen; wenn sich nicht bei allen Dysenterieerregern Enterotoxine mit Hilfe des Tierexperimentes nachweisen lassen, so kann das mannigfache Gründe haben (verschiedene Empfänglichkeit von Tier und Mensch, besondere Bedingungen, an welche die Giftproduktion geknüpft ist u. dgl.) und beweist nicht die Ungiftigkeit der betreffenden Stämme, wenn sie auf oder in der Darmmucosa parasitieren. Von diesem Standpunkt aus könnte die Bewertung der Dysenteriesera nach dem Grade ihrer antiinfektiösen Qualitäten ein Mißgriff sein, um so mehr, als man diese Qualitäten im *Peritonealversuch* feststellt, der mit der *natürlichen im Darm lokalisierten Ruhrinfektion* des Menschen nicht auf eine Stufe gestellt werden darf.

Diese Sachlage verweist die Bestrebungen um den Ausbau der Serotherapie der bacillären Dysenterie auf den einzigen, unter den obwaltenden Umständen gangbaren Weg. Wie auch *Doerr* verlangt, müssen *Erprobungen der verschiedenen Dysenterieheilsera am kranken Menschen* in großem Stile durchgeführt werden; aber nicht in der bisherigen, grob empirischen, planlosen und die Spezifitätsgesetze ignorierenden Art, sondern systematisch und zunächst ausschließlich so, daß *Infektionen mit bekannter Ätiologie unter die Wirkung homologer Sera gestellt* und daß ausgiebige Kontrollen zum Vergleiche herangezogen werden, Kontrollen,

---

[1]) Die Untersuchungen von *J. Dumas* und *D. Combiesco* klären diesen Zusammenhang nicht völlig auf. Die genannten Autoren flößten Kaninchen an 4 aufeinanderfolgenden Tagen je 10 ccm Shigatoxin ein, und zwar so, daß sie die Giftbouillon aus einer Pipette in die Mundhöhle der Tiere einströmen ließen; die Kaninchen schluckten dann die Flüssigkeit spontan, und es wurde so das Einströmen in den Larynx und die Trachea ebenso vermieden wie die Entstehung von Verletzungen, welche bei der Anwendung von Schlundsonden kaum zu umgehen sind. 24 Stunden nach der letzten Toxinmahlzeit magerten die Tiere ab, zeigten Lähmungen der Extremitäten, Diarrhöen und gingen rasch ein. Bei der Autopsie fand man Ödeme und Schleimhautblutungen des Coecums. Das Verschlucken großer Mengen Shigabacillen hatte denselben Erfolg. Überlebten die Tiere, so erwiesen sie sich gegen die intravenöse Injektion der 4fach tödlichen Dosis Shiga-Bouillonkultur refraktär. Ob man hier eine direkte Einwirkung des Toxins auf die intakte Darmschleimhaut annehmen darf, erscheint zweifelhaft; sicher kam es zur Resorption (Lähmungen, resultierende Immunität!), und es könnte sich daher die Sache so verhalten, daß das Toxin zuerst (infolge von Darmüberlastung) resorbiert wurde und erst von der Blutbahn aus die Cöcalwand schädigte.

die sich nicht nur auf die Weglassung der spezifischen Serotherapie zu beschränken hätten, sondern die *Möglichkeit unspezifischer Heilwirkungen*, wie sie von normalem Pferdeserum (*Singer*) oder von heterologem Immunserum ausgehen können, berücksichtigen müßten. Eine derartige kritische Erprobung „am Krankenbett" könnte dem Charakter des Experimentes weitgehend angenähert werden und würde nicht nur über den wahren Nutzen und die Grenzen der Serotherapie Aufschluß bieten, sondern auch Gelegenheit geben, festzustellen, ob und in welchem Maße ein beobachteter Heilwert eines Serums von der *absoluten Menge*, vom *Antitoxingehalt*, von experimentell bestimmbaren *antiinfektiösen Wirkungsqualitäten* dependiert. *Erhebungen in den zwei an letzter Stelle genannten Richtungen setzen aber als selbstverständlich voraus, daß man das Antitoxin und die antiinfektiösen Eigenschaften der Sera vor ihrer therapeutischen Anwendung bereits gemessen hat, und zwar mit Methoden, welche konstante Resultate liefern, und mit Hilfe eines unveränderlichen oder jederzeit reproduzierbaren Maßstabes.* Stellt es sich heraus, daß der Heilwert für den kranken Menschen eine Funktion eines der gemessenen Immunkörper ist, so kann die zunächst nur als Provisorium gedachte Meßmethode ohne weiteres als Standardverfahren der Wertbestimmung definitiv übernommen werden; dagegen hätte es natürlich keinen Sinn, Meßmethoden, deren Ergebnis für den therapeutischen Effekt nachgewiesenermaßen ganz irrelevant ist, auf Grund theoretischer Erwägungen hypothetischer Natur dauernd beizubehalten.

Besitzen wir aber bereits allseits anerkannte Methoden, welche eine exakte Titration des Antitoxins und der bekannten, experimentell meßbaren Wirkungsqualitäten der Antidysenteriesera gestatten? Wie ein kurzer Überblick zeigen wird, ist das nicht der Fall, und die hier bestehende Lücke muß also zunächst ausgefüllt werden, bevor man an die kritisch-empirische Revision der Serotherapie der Ruhr herantreten kann.

Die *antiinfektiösen Eigenschaften* der Dysenteriesera prüften schon *Shiga* und *Kruse* am *Meerschweinchen* (vgl. *Doerr*, Das Dysenterieantitoxin in *Kraus-Levaditis* Handb. d. Technik und Methodik d. Immunitätsforschung), und dieses Versuchstier wurde auch später für den gedachten Zweck fast ausschließlich verwendet. Seine spezielle Eignung beruht darauf, daß es gegen die enterotrope Giftkomponente der Shigabacillen vollständig, gegen die unspezifischen Giftwirkungen sämtlicher Dysenterieerreger weitgehend refraktär ist, so daß die Infektiosität und ihre Beeinflussung durch antibakterielle Immunsubstanzen rein zum Ausdruck kommen kann. Die neueren Angaben von *Dumas* und *Combiesco* (C. r. Soc. Biol., Bd. 87, S. 942) bestätigen nur diese Tatsache, indem sie lehren, daß Meerschweinchen sogar $^1/_{100}$ Schrägagarkultur intravenös oder subcutan vertragen, ohne akut zu verenden; daß man

nach Injektion sehr großer Mengen lebender Shigabacillen die Keime zunächst in allen Organen, dann nur mehr im Darminhalt und nach 4 Tagen auch nicht einmal mehr dort vorfindet, und daß die Darmwand zwischen dem 2. und 4. Tag gewisse anatomische Veränderungen aufweist, kann nicht im Sinne spezifischer Giftwirkung gedeutet werden, um so mehr, da Kontrollen mit atoxischen Dysenteriestämmen, Colibakterien etc. nicht ausgeführt wurden. Die Darmschleimhaut fungiert bekanntlich als allgemeines Ausscheidungsorgan (vgl. auch *Richet* fils) und eliminiert nicht nur Dysenterie-, sondern auch Typhus- und Paratyphusbacillen (*J. Balteano*), ja unbelebte Partikel wie Kohleteilchen, wenn man genügende Mengen intravenös oder subcutan einspritzt (*Richet* und *Lesné*). — *Weiße Mäuse* kämen nur für atoxische Stämme in Betracht, wo sie auch schon von *Kraus* und *Doerr* benutzt wurden; für Shigagifte und für die Toxine der *Sonne*schen Typen ist dagegen die weiße Maus empfindlich, so daß man Kombinationen von Vergiftung und Infektion, bei der Serumauswerung solche von antitoxischer und antibakterieller Schutzwirkung erhalten würde.

Am *Meerschweinchen* wurde das Titrieren der antiinfektiösen Eigenschaften wieder mannigfach variiert, indem man die lebenden Bacillen bald *subcutan*, bald *intraperitoneal*, das zu prüfende Serum *präventiv*, *gleichzeitig* oder *kurativ* einspritzte und die beiden Reaktionskomponenten entweder *getrennt* (eventuell an verschiedenen Applikationsstellen) oder miteinander *gemischt* einverleibte. *Flexner* und *Amoss* gehen neuerdings bei ihren polyvalenten Sera so vor, daß sie lebende Kulturen von *Shiga- und Flexner*-Bacillen mit den Sera mengen und die Gemische Meerschweinchen von 225 g intraperitoneal einspritzen; als Testmenge gilt die zweifache Dosis letalis minima, als Titer des Serums jene Quantität, welche den Tod des Tieres gerade noch verhindert. — Ob aber eines dieser Verfahren den beim Menschen in Aktion tretenden Heilfaktor mißt, muß — wie schon betont — als ungewiß bezeichnet werden.

Weit gesicherter scheint der praktische Wert der Antitoxintitration zu sein, die sich bisher naturgemäß nur auf jene Sera erstrecken konnte, welche durch Immunisierung mit Shigabacillen oder mit den Giften dieses Typus gewonnen worden waren. Um so bedauerlicher ist es, daß die Meinungen über das optimale Verfahren der Antitoxinbestimmung noch immer geteilt sind. Zunächst konnte keine Einigung über die *Wahl des toxinempfindlichen Versuchstieres* erzielt werden. Schon die ersten Angaben von *Conradi*, *Neisser* und *Shiga*, *Vaillard* und *Dopter* wiesen auf das Kaninchen hin, bei dem die Darmwirkung so ausgeprägt ist, und eine ganze Reihe von Autoren (*Rosenthal*, *Todd*, *Kraus* und *Doerr*, *Schottelius*, *Inomata*, *Fukuhara*, *Flexner* und *Amoss*, *Olitsky* und *Kligler*, *Přibram* u. v. a.) konnten in der Folge Shigatoxine und die korrespon-

dierenden Antisera am Kaninchen auswerten, ohne daß in den sehr zahlreichen Titrationsreihen Unregelmäßigkeiten zutage traten, welche die Ergebnisse der Eichungen in Frage gestellt hätten. Die Bewertung der Shigatoxine und ihrer Antitoxine am Kaninchen bewährte sich nicht nur durch mehr als ein Jahrzehnt im Betriebe mehrerer Seruminstitute, sondern man kann sogar ruhig behaupten, daß alles, was wir an Tatsachen über Dysenteriegifte und ihre Antitoxine wissen, am *Kaninchen* als Reagens festgestellt wurde. Allerdings hängt die gesetzmäßige Reaktivität der Kaninchen, wie *Kraus* und *Doerr* zeigten, davon ab, daß man Tiere von nicht zu geringem und nicht zu großem Körpergewicht, am besten solche von 1500 g verwendet, und daß man die Giftlösungen *intravenös* injiziert; *subcutan* oder *intraperitoneal* eingespritzt wirken die Shigatoxine nicht nur schwächer, sondern es treten auch weit stärkere individuelle Schwankungen auf. Hält man sich aber an diese Vorschriften, dann bestehen (nach *Kraus* und *Doerr*) zwischen Shigatoxin und Kaninchen Beziehungen von analoger Konstanz wie zwischen subcutan injiziertem Diphtheriegift und Meerschweinchen von 250 g, d. h. *die individuellen Faktoren sind auf das im Tierexperiment unvermeidliche Ausmaß reduziert.* Ganz zum Verschwinden können diese Faktoren bekanntlich überhaupt nicht gebracht werden; sie finden sich auch, worauf man oft zu vergessen scheint, bei den mit Diphtherietoxin vergifteten Meerschweinchen, wie nachstehender Versuch *Madsens* erkennen läßt, in dem 7 Meerschweinchen mit 0,006 und 7 mit 0,007 ccm einer bestimmten Giftbouillon subcutan injiziert wurden:

	0,006 ccm		0,007 ccm
1.	lebt	1.	† $8^1/_2$ Tage
2.	† 9 Tage	2.	† 5 „
3.	† $7^1/_2$ „	3.	† 5 „
4.	† $7^1/_2$ „	4.	† 5 „
5.	† 5 „	5.	† 4 „
6.	† $2^1/_2$ „	6.	† 3 „
7.	† $1^1/_2$ „	7.	† $2^1/_2$ „

Man sieht, daß namentlich die Lebensdauer unter sonst ganz gleichen Verhältnissen innerhalb weiter Grenzen schwankt. Hätte man von den 14 Tieren nur Nr. 6 und Nr. 7 der ersten und Nr. 1 und 2 der zweiten Vertikalreihe eingestellt, so würde sich vorerst der paradoxe Schluß ergeben, daß das „*Optimum der Giftwirkung*“ bei der kleineren Dosis liegt, ein Schluß, den *Sachs* und *Georgi* aus ähnlichen Resultaten beim Dysenterietoxin de facto gezogen haben. *Sachs* und *Georgi* betonen zwar ausdrücklich, daß das geschilderte Verhalten immer nur zufällig festzustellen und selbst bei sofortiger Wiederholung der Experimente mit demselben Gift nicht mehr zu beobachten war; dann darf man aber eben nicht von einem Optimum der Giftwirkung bei der kleineren Dosis sprechen, da der *Mangel an Reproduzierbarkeit* klar beweist, daß die

Ursache der Unstimmigkeit nicht in der exakt bemeßbaren Giftdosis, sondern ausschließlich in der wechselnden Empfindlichkeit der Versuchstiere begründet sein kann. Man muß diese individuellen Differenzen durchaus nicht ausnahmslos auf konstitutionelle Momente zurückführen. Fast alle Toxine, speziell das Diphtherie- und das Dysenterietoxin, wirken auf *mehrere* Gewebe und Organe von sehr verschiedener Lebenswichtigkeit, und man darf ohne weiteres annehmen, daß die Art der Verteilung im Körper und damit die auf die lebenswichtigen Apparate entfallende Quote je nach dem Funktionszustande der giftaffinen Parenchyme und je nach den allgemeinen und lokalen Zirkulationsverhältnissen variiert; die neueren Arbeiten von *Hahn* und *Skramlik*, *Bieling* und *Gottschalk*, in gewissem Sinne auch die Untersuchungen von *Forssmann* rechtfertigen solche Anschauungen, welche der Konstanz der Reaktivität von Tieren einer Spezies gegen ein bestimmtes Toxin eine Grenze ziehen.

Kolle, *Heller* und *de Mestral* waren im Gegensatze zu *Kraus* und *Doerr* von den Ergebnissen der Dysenterietoxin-Auswertung am *Kaninchen* nicht befriedigt; nach ihrer Angabe erzielt man zwar „bisweilen außerordentlich gleichmäßige Versuchsreihen", „plötzlich versagt" aber „das Gift, auch in großer Dosis, aus unkontrollierbaren Gründen". Die *weiße Maus* schien ihnen eher geeignet, sie bezeichnen ihre Empfänglichkeit für das Ruhrgift als „*außerordentlich gleichmäßig*" und konnten Unregelmäßigkeiten in den Versuchsreihen bei der *intraperitonealen Einspritzung* von Bouillontoxin nur dann beobachten, „wenn Mäuse von sehr verschiedener Größe benutzt wurden". *Sachs* und *Georgi* räumten aber, als sie sich mit der Frage zehn Jahre später erneut beschäftigten, ein, daß gewisse individuelle Schwankungen der Giftempfindlichkeit denn doch auch bei Mäusen vorkommen und versuchten sogar, dieselben abzuschwächen, indem sie — in Anlehnung an die Erfahrungen, welche *Kraus* und *Doerr* beim Kaninchen gemacht hatten — die *intraperitoneale* durch die *intravenöse* Injektion ersetzten. Es stellte sich heraus, daß das Dysenterietoxin bei intravenöser Einverleibung stärker und rascher wirkt als bei intraperitonealer, und daß die erwähnten Schwankungen *weniger ausgeprägt in Erscheinung traten*; ganz verschwanden die Differenzen der Empfindlichkeit allerdings auch bei der intravenösen Methode nicht, sondern waren — zumal nach der Einspritzung geringer Giftmengen — noch immer zu konstatieren. Durch die von *Sachs* und *Georgi* vorgeschlagene und in Deutschland offiziell eingeführte Änderung der Injektionstechnik ist die Angelegenheit offenbar in ein neues Stadium getreten; die mit intravenösen Injektionen gewonnenen Resultate an der weißen Maus stehen mit den Befunden von *Kraus* und *Doerr* (die das Gift nur subcutan oder intraperitoneal einspritzten) nicht in Widerspruch, sondern bedürfen nur

der Nachprüfung. *Sachs* und *Georgi* behaupten übrigens auch nicht mehr, daß das Kaninchen unbrauchbar sei, sondern deuten nur an, daß seine Verwendung zu größeren Versuchsreihen in der Nachkriegszeit aus „äußeren Gründen" (Kosten, Unmöglichkeit der Beschaffung) auf erhebliche Schwierigkeiten stoßen kann.

Das Verfahren von *Sachs* und *Georgi* blieb — soweit die Literatur darüber aufklärt — auf Deutschland beschränkt; in Frankreich, wo die Maus für Titrationen verwendet wird, beharrte man auf der subcutanen Einverleibung des Giftes.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß *Sordelli*, dem das Kaninchen zu unregelmäßig reagierte, der aber andrerseits die intravenöse Injektion bei der weißen Maus für technisch schwierig erachtete, eine in Südamerika unter dem Namen „*Misto*" bekannte Vogelart (*Sicalis luteola*, *S. arvensis*) benützte; die 15—20 g schweren Vögel werden in die Brustmuskeln gespritzt und sollen sowohl bei direkter Giftauswertung wie bei der Titration antidysenterischer Sera vortreffliche Resultate liefern. Sie sind 2,5 mal giftempfindlicher wie Kaninchen und sehr sensibel gegen Phenol (carbolisierte Sera!). *Sordelli* wollte sich bemühen, eine Vogelspezies ausfindig zu machen, die man in allen Ländern beschaffen kann, hat aber seither keine Mitteilung darüber veröffentlicht.

Kontrovers ist jedoch nicht nur die Wahl des toxinempfindlichen Testtieres, sondern auch die *Art der Antitoxinbestimmung selbst*. *Rosenthal* und namentlich *Todd* prüften die Wirkung von **Toxin-Antitoxin-Gemischen**, eine Methode, die von *Vaillard* und *Dopter*, *Schottelius*, *Kolle*, *Sachs* und *Georgi*, *Flexner* und *Amoss*, *Sordelli*, *Inomata*, *Fukuhara* u. a. beibehalten, aber keineswegs einheitlich gehandhabt wurde. So konstatiert man Differenzen schon hinsichtlich der *Bindungszeit*. Nach *Todd*, dessen Angaben *Sachs* und *Georgi* bestätigen konnten, findet die Vereinigung der beiden Reaktionskomponenten sehr rasch (bei 37° C in weniger als 5 Minuten) statt; das deutsche, im Frankfurter Institut geübte Verfahren verlangt einen halbstündigen Kontakt bei Zimmertemperatur, *Fukuhara* hält eine Stunde bei 37° C für nötig, und dieses Ausmaß der Bindungszeit verwenden auch *Flexner* und *Amoss*. Variiert hat man weiter die Höhe der Dosis Testgift, die mit fallenden Antitoxinmengen versetzt werden soll. Für die weiße Maus schreibt das deutsche Verfahren die 4fache letale Menge vor, für Kaninchen benützten

Rosenthal	das	10fache	Multiplum	der	D. l. m.	
Todd	„	20	„	„	„	„
Inomata	„	30	„	„	„	„
Fukuhara	„	100	„	„	„	„
Flexner u. *Amoss*	„	4	„	„	„	„

Ob das Gift durch das antitoxische Serum neutralisiert wurde oder nicht, beurteilen die meisten Autoren darnach, ob die mit den Gemischen

injizierten Mäuse oder Kaninchen *dauernd oder während einer bestimmten konventionellen Beobachtungszeit am Leben bleiben.* In der Beschreibung des deutschen Verfahrens der Wertbemessung der Dysenteriesera bezeichnen beispielsweise *Kolle* und *Hetsch* ein Präparat als „einfaches" Ruhrserum, von welchem Mengen bis zu 0,001 ccm (der Prüfungsgiftdosis zugesetzt) „*lebensrettend*", d. h. so wirken, daß die intravenös gespritzten Mäuse den 6. Tag überleben. Es entspricht das offenbar nicht dem *Glattwert* (Lo *Ehrlichs*); denn es können sich Tiere, welche Diarrhöen und schwere, Tage lang anhaltende Paresen oder Lähmungen zeigen, welche also zweifellos ein unterneutralisiertes Gemenge erhalten haben, schließlich wieder erholen und entweder völlig genesen oder erst nach längerer Zeit marantisch eingehen. Auch der Fall ist möglich, daß die Symptome erst *nach mehrtägiger Latenz* in Erscheinung treten und zum verspäteten Exitus führen. *Doerr, Kraus* und *Doerr, Kolle, Heller* und *de Mestral* konnten solche Beobachtungen am Kaninchen machen; *bei weißen Mäusen sind sie jedoch mindestens ebenso häufig.* Ein paar Belege mögen hier Platz finden, welche die erwähnten Kombinationen illustrieren.

Maus 82 erhält 0,3 Toxin VI (Bouillonkulturfiltrat) intravenös. Am 3. Tage Lähmungen beider Hinterextremitäten, die am 4. Tage maximal sind. Am 6. Tage sind die Lähmungen schwächer, am 7. ganz verschwunden. Das Tier bleibt während der weiteren Beobachtungszeit (30 Tage) normal.

Maus 366 erhält 0,1 Toxin VII intravenös, nach 30 Min. 0,005 ccm Serum 2000 gleichfalls intravenös. Bleibt 6 Tage gesund. Am 7. Tage Lähmungen, die nach weiteren 5 Tagen zurückgehen. Überlebt dauernd.

Maus 728 erhält 0,1 Toxin VII intravenös, nach 30 Min. 0,025 ccm Serum intravenös. Bleibt 6 Tage symptomfrei. Am 7. Tage komplette Lähmung beider Hinterextremitäten, welche bis zum Exitus (9. Tag) anhält.

Maus 730 erhält 0,1 Toxin VII intravenös, nach 30 Min. 0,65 Serum 2000 intravenös. 10 Tage symptomfrei. Exitus am 11. Tag ohne Vorboten.

Maus 745 erhält 0,0075 Toxin XI intravenös. 11 Tage symptomfrei. Am 12. Tage schwere Lähmung der Hinterextremitäten, am 13. Tage Exitus.

Es erscheint zweifellos zweckmäßiger, *nicht* auf das Überleben, sondern auf das Ausbleiben manifester Symptome abzustellen, also den effektiven *Glattwert* zu bestimmen, schon deshalb, weil die Resultate a priori konstanter sein müssen. *Fukuhara* wollte den L_+-Wert ermitteln und definiert denselben als die kleinste Giftmenge, welche mit der (von *Fukuhara* normierten) Antitoxineinheit gemischt und intravenös injiziert den Tod des Kaninchens innerhalb von 4—5 Tagen herbeiführt; aus den wiedergegebenen Protokollen gewinnt man jedoch die Überzeugung, daß die Fixierung der L_+-Dosis willkürlich und der Wert somit nicht sicher reproduzierbar ist.

Kraus und *Doerr* lehnten das *Neutralisationsvermögen in vitro* als Basis der Wertbemessung der antitoxischen Ruhrsera gänzlich ab und verlangten, daß die *kurative Wirkung* im Tierversuch bestimmt werden

müsse, und zwar derart, daß man beim Kaninchen in die eine Ohrvene Toxin, in die der anderen Körperseite Serum „*gleichzeitig*“ einspritzt; der Ausdruck „gleichzeitig“ war insofern nicht ganz exakt, als die Injektionen nacheinander, also mit einem zwischengeschalteten, möglichst kurzen, aber nicht genau präzisierten Intervall ausgeführt wurden. Als zu Heilzwecken am Menschen geeignet bezeichneten *Kraus* und *Doerr* ursprünglich nur solche Sera, welche *mindestens* bei dieser „*getrennten, gleichzeitigen*“ Injektion gegen die einfach letale Dosis zu schützen vermögen; unter diesem „mindestens“ war zu verstehen, daß Sera, welche selbst dann die Tiere retten, wenn sie erst *einige Zeit*, z. B. 30 oder 60 Minuten *nach* vorausgegangener Giftinjektion einverleibt werden, hinsichtlich ihrer Heilkraft höher einzuschätzen seien. An die Serumdosis, welche gegen die einfach letale Giftmenge schützen soll, stellten *Kraus* und *Doerr* zunächst überhaupt keine Anforderung; der Wert der Sera sollte eben nicht an der Quantität des Antitoxins, sondern an einer von der Quantität unabhängigen Eigenschaft, der *Avidität* oder *Reaktionsgeschwindigkeit*, gemessen werden. Der konsequente Ausbau dieses Grundgedankens hätte schließlich dazu führen müssen, bei konstanter Dosis Toxin und gleichbleibender Serummenge das Intervall zwischen den beiden Injektionen abzustufen. Bei der Übernahme in den praktischen Betrieb des Wiener Serotherapeutischen Institutes ist man jedoch davon abgegangen und hat als untere Grenze für die Serummenge, welche bei „gleichzeitiger, getrennter“ Injektion das Kaninchen schützen muß, 0,1 ccm (*Pribram* und *Halle* geben 0,1—0,2 ccm an) fixiert. Auch die *einfache* Giftdosis wurde anscheinend nicht immer beibehalten, sondern durch die zwei- oder gar vierfache ersetzt (*Bächer* und *Laub, Lentz, Fukuhara*).

Für die getrennte Auswertung kann man wohl auf einen *absolut unveränderlichen Maßstab* von vornherein verzichten, da feinere Ausschläge bei dieser Methode weder angestrebt noch auch zur Beurteilung herangezogen werden. Es genügt, die Dosis certe letalis irgendeines kräftiger wirkenden Bouillonkulturfiltrates, die sich ohnehin innerhalb nicht zu weiter Grenzen (0,05—0,25 ccm) bewegen wird (*Doerr, Kolle*).

Anders liegt die Sache bei der Bestimmung der Gemischtwerte, wo recht kleine Differenzen eine Rolle spielen können. Hier steht man erneut vor der schon von *Ehrlich* formulierten Alternative: *Testgift* oder *Testserum*. *Sachs* und *Georgi* sowie *Fukuhara* haben sich für *Standardsera* entschieden, welche in völlig trockenem Zustande in Vakuumröhrchen eingeschmolzen werden. Ob dieser beim Diphtherieserum unvermeidliche Umweg auch beim Dysenterieserum beschritten werden *muß*, darf aber zur Zeit als fraglich bezeichnet werden. Das Dysenterietoxin ist viel beständiger als andere Bakteriengifte und die Möglichkeit, dasselbe unter ähnlichen Bedingungen wie Standardsera unverändert

aufzubewahren, zweifelsohne vorhanden. *Fukuhara* gibt an, daß in den *Ehrlich*schen Vakuumröhren konservierte *Dysenterietrockentoxine* jahrelang ihre Wirksamkeit ohne jede Einbuße behielten. Derselbe Autor behauptet ferner, daß die Zersetzung der alternden Dysenterietoxine darauf beruht, daß sich die Toxinmoleküle in atoxische Derivate umwandeln, welchen kein Bindungsvermögen für Antitoxin zukommt. Der Verlust der Giftigkeit vollzieht sich somit im Gegensatze zum Diphtherietoxin ohne Bildung von *Toxoiden*. Könnte also nachgewiesen werden, daß zwischen Toxizität und Neutralisierbarkeit ein durchgängiger Parallelismus besteht, so wäre die zweite Voraussetzung für die Benutzung eines direkten Toxinmaßstabes erfüllt.

Nicht unerwähnt können die Bestrebungen bleiben, das Shigatoxin in „*Partialgifte*" aufzuspalten. Die einschlägigen Arbeiten von *Horimi* sowie von *Fukuhara* und *Ando* besitzen allerdings geringere Bedeutung. Wenn beispielsweise *Horimi* ein Blinddarm-, ein Dickdarm-, ein Nervengift etc. unterscheidet, so wird, wie *Přibram* und *Halle* sehr richtig bemerken, die Differenzierung in das Toxin anstatt in den hoch differenzierten Tierkörper verlegt. *Přibram* und *Halle* verweisen darauf, daß man mit demselben Rechte bei chemisch einheitlichen Stoffen wie etwa *Wismut* mehrere Gifte (ein Darm- und ein Nervengift) annehmen dürfte. Nicht so leicht kann man sich mit den Untersuchungen von *Olitsky* und *Kligler*, von *Thjøtta* und *Sundt* sowie von *R. C. Robertson* abfinden. *Doerr* hatte 1907 gezeigt, daß das Erhitzen hochwirksamer Lösungen auf 60—70° C ein Mittel darstellt, um die sonst inkonstanten Darmveränderungen beim Kaninchen sicherer zu erzeugen; *Doerr* ließ es in Schwebe, ob das Phänomen auf der Existenz einer besonderen, thermolabilen neurotoxischen Komponente beruht, oder ob zwar das nämliche Gift auf Nervensystem und Darm wirkt, der Darm aber schon durch geringere Dosen affiziert wird als das Rückenmark. *Olitsky* und *Kligler* knüpften — ohne die Angaben von *Doerr* zu zitieren — an diese Beobachtung an und gelangten schließlich dazu, zwei distinkte Gifte der Shigabacillen zu supponieren: ein relativ thermolabiles, schon in jungen Bouillonkulturen nachweisbares, neurotropes Exotoxin und ein thermostabiles, erst in späteren Wachstumsperioden auftretendes, enterotropes Endotoxin. Durch Immunisierung mit reinem Exotoxin wollen *O.* und *K.* ein antiexotoxisches Serum hergestellt haben, welches nur das neurotrope Exotoxin absättigte; in einem Gemisch von Exo- und Endotoxin neutralisierte dieses Serum bloß die erstgenannte Komponente, so daß das Gemisch nachher nur mehr Darmerscheinungen hervorzurufen imstande war. Die Autoren vindizieren ihren Befunden eine spezielle Bedeutung für die Serotherapie; ein heilkräftiges („potent") Antidysenterieserum müsse Antiexotoxine ebensowohl wie Antiendotoxine enthalten, was durch Immunisierung mit lebender Kultur

erreicht werden könne. Ein von ihnen untersuchtes, nach dem Schema von *Flexner* und *Amoss* hergestelltes Serum neutralisierte pro Kubikzentimeter 2000 tödliche Dosen Exotoxin und 400 tödliche Dosen Endotoxin. Eigentlich sollte man aber in Anbetracht des Vorherrschens der Darmsymptome bei der menschlichen Ruhr das Überwiegen des Antiendotoxins fordern — wenn die Experimente von *O.* und *K.* zur Begründung der von ihnen aufgestellten Hypothese voll ausreichen. Das ist aber bei objektiver Kritik nicht der Fall. Vor allem fehlt die Gegenprobe mit einem rein antiendotoxischen Serum, welches durch Immunisierung mit erhitzten Giften leicht darstellbar sein müßte. Dann aber darf man beim Kaninchen auf das Ausbleiben der Darm- oder auch der Nervensymptome in vereinzelten Versuchen gar kein Gewicht legen, wie schon aus älteren Arbeiten klar hervorgeht. Neuerlich nahmen denn auch *Dopter*, *Dumas* und *Combiesco* zu der Lehre von der Duplizität der Shigagifte in ablehnendem Sinne Stellung und teilten mit, daß sie mit den auf 80° C durch 1 Stunde erhitzten Bouillongiften, mit dem Natriumsulfattoxin von *Rowland*, mit lebenden oder durch Erhitzen abgetöteten Mikroben, ja selbst durch Verfütterung der auf 75° C erhitzten Bakterienleiber *nervöse Störungen* (*Paralysen*) mit und ohne begleitende Darmsymptome erzeugt hatten. Gegen die Auffassung von *O.* und *K.* spricht übrigens die schon von *Doerr* hervorgehobene und scheinbar wieder in Vergessenheit geratene Tatsache, daß die Wirkung auf das Nervengewebe und jene auf die Cöcalschleimhaut qualitativ identisch sind, d. h. daß sich beide aus den gleichen anatomischen Elementen (Ödem, Hämorrhagie, Nekrose) aufbauen.

Vorderhand besteht jedenfalls keine Veranlassung, die Vorstellungen von der komplexen Natur der Shigatoxine bei der Wahl der Methoden für die Antitoxintitration zu berücksichtigen. Aber selbst nach dieser Einschränkung bleiben — wie auseinandergesetzt wurde — noch viele Punkte übrig, welche eine gründliche Bearbeitung erfordern, um eine gesicherte der Diskussion entrückte Grundlage zu schaffen.

Die nachstehenden Untersuchungen greifen aus der großen Zahl kontroverser Fragen nur einige wenige, deren Erledigung zunächst gewünscht werden muß, heraus; dem Zwecke entsprechend wurde eine sehr große Zahl von Versuchsreihen ausgeführt und *ohne jede Korrektur* wiedergegeben, um dem Leser eine zuverlässige Kontrolle der gezogenen Schlüsse zu ermöglichen.

I. Vergleich der Reaktion des Kaninchens und der weißen Maus auf intravenös injizierte Toxine von Shigastämmen.

Da über die unregelmäßige Empfindlichkeit des Kaninchens gegen subcutan oder intraperitoneal einverleibtes *Shiga*-Gift übereinstimmende Angaben (*Kraus* und *Doerr*, *Doerr*, *Kolle*, *Heller* und *de Mestral*)

vorliegen, schien es überflüssig, diesen Modus der direkten Giftauswertung nochmals einer Nachprüfung zu unterziehen. Auch für die weiße Maus ziehen *Sachs* und *Georgi* die intravenöse Injektion der intraperitonealen vor, weil die erstere die individuellen Schwankungen zurückdrängt und überdies die Dosis letalis erniedrigt, so daß unspezifische Wirkungen der gifthaltigen Flüssigkeiten leichter vermieden werden können. Von der Richtigkeit der Behauptung, daß die weiße Maus auf das in die Blutbahn gebrachte Gift stärker reagiert, vermochten wir uns selbst zu überzeugen. Für eine bestimmte Lösung belief sich die *Dosis certe letalis* bei sehr genauer Titration auf *0,0075 ccm* intravenös, dagegen auf *0,075* subcutan oder intraperitoneal; eine ähnliche Proportion bestand hinsichtlich der Dosis letalis minima (*0,001 ccm* zu *0,01 ccm*). Die Superiorität der intravenösen Injektion wurde ja auch bei der Festsetzung der für Deutschland gültigen Wertbemessung der Dysenteriesera offiziell anerkannt; es ist das um so bedeutungsvoller, als die Ausarbeitung des Verfahrens in dem von *Kolle* geleiteten Institute erfolgte, der vor der Einführung der intravenösen Mausinjektion in die serologische Technik für die (sicher einfachere) intraperitoneale Applikation eingetreten war. Alle diese Erwägungen stimmten überdies mit der Forderung überein, *Maus und Kaninchen unter möglichst identischen Bedingungen zu vergleichen.*

Hinsichtlich der Symptomatologie der Vergiftung bei der weißen Maus haben *Kolle*, *Heller* und *de Mestral* genügende Aufschlüsse gegeben. Wie beim Kaninchen dominieren auch hier die nervösen Störungen, speziell die Lähmungen der Hinterextremitäten, die einen verschiedenen Grad aufweisen können; der paralytische Tractus posterior erscheint in der Rückenmodellierung deutlich gegen die vordere Körperpartie abgesetzt. *Kolle* und seine Mitarbeiter erwähnen auch, daß die Lähmungen bisweilen ganz akut einsetzen, wenn man die Tiere am Schwanz aus dem Käfig hebt, und nehmen an, daß die Abwehrbewegungen die veranlassende Ursache sind. *Sachs* und *Georgi* beobachteten überdies eine dem akuten Auftreten der Paralysen vorangehende auffallend starke Reflexerregbarkeit, „die manchmal schon bei verhältnismäßig geringem akustischem oder mechanischem Reiz zur Auslösung schwerster Krämpfe führt". „Nicht selten erscheinen die Mäuse noch völlig gesund, um im Verlaufe von einer oder wenigen Stunden der Erkrankung zu erliegen." Wenn man die Mäuse täglich ein- oder zweimal zwecks Feststellung ihres Zustandes aus den Behältnissen herausholt, bekommt man diese reflektorischen Krampfparoxysmen häufig zu Gesicht. Hie und da macht das Tier vorerst noch ein paar hohe Sprünge oder wilde Laufbewegungen; dann wird plötzlich die ganze Körpermuskulatur von einem intensiven tonischen Streckkrampf ergriffen, der den Kopf in den Nacken zieht und die vorderen sowohl wie die hinteren Extremitäten maximal und grad-

linig extendiert, so daß die Zehen nach dem caudalen Pol zeigen. Schon der erste Paroxysmus kann letal endigen; in anderen Fällen werden mehrere Attacken überstanden, indem sich die Spasmen nach $^1/_2$—1 Min. lösen und das zunächst sehr erschöpfte Tier allmählich wieder zu Kräften kommt. Der Tod tritt entweder im Anfall selbst ein oder erst nach erfolgter Erschlaffung der kontrahierten Muskulatur; im ersten Falle kann die typische Krampfstellung durch die Totenstarre fixiert werden, so daß man noch nachträglich erkennt, welche Mäuse an *nicht beobachteten Krampfzuständen* (z. B. während der Nacht) eingegangen sind.

Bei einer im Anfall verendeten und in toto in Formalin gehärteten Maus wurde das Gehirn und das Rückenmark (samt der knöchernen, entkalkten Umhüllung) vom Kopf- bis zum Caudalende in kleine Partien zerlegt und von jeder einige Schnitte durchmustert. Es fanden sich ganz frische Blutungen im Hirnstamm und im Seitenstrang des Dorsalmarkes; ob diese Befunde ausreichen, um nicht nur die Lähmungen, sondern auch die reflektorisch auslösbaren allgemeinen Krämpfe zu erklären, soll dahingestellt bleiben. Sicher ist jedoch, *daß letztere im Vergiftungsbild des Kaninchens vollständig fehlen.* Vor der Versuchung, ein eigenes „*Mausgift*“ oder ein „*Dysenterospasmin*“ anzunehmen, schützt die immunologisch erweisbare Identität des auf die beiden Tierspezies wirkenden Giftstoffes; und die Tatsache, daß ein und dasselbe Toxin bei der Maus (trotz gleicher Neurotropie) andere Funktionsstörungen erzeugt wie beim Kaninchen, kann als Warnung dienen, jede Wirkungsdifferenz (z. B. auch bei Mensch und Kaninchen) auf eine Vielheit der in einem Substrat vorhandenen giftigen Substanzen zu beziehen.

Das *Injektionsvolum* wurde mit 0,5 ccm bemessen und zur Auffüllung *0,85% NaCl-Lösung* verwendet, nachdem sich bei einer bestimmten Gelegenheit herausgestellt hatte, daß sterile Bouillon unter gewissen (nicht näher analysierten) Umständen von den Gefäßen aus unspezifische Giftwirkungen auszuüben vermag. Gegen Luftembolie ist die Maus sehr empfindlich, offenbar wegen der Enge der Herzhöhlen und des minimalen Kalibers selbst größerer Arterien; injiziert man auch nur ein winziges Luftbläschen, so gehen die Tiere schockartig ein, wobei ein so enormer Exophthalmus entsteht, daß die Bulbi wie kleine Glasperlen kugelig aus der Lidspalte hervortreten.

Tiere, bei denen die *quantitativ-intravenöse* Injektion des gesamten Volums mißglückte, wurden sofort verworfen; dank der Geschicklichkeit von Frl. *B. M. Herzog*, welche die intravenösen Infektionen an den Mäusen ausführte, und der ich für ihre wertvolle Mitarbeit auch an dieser Stelle bestens danke, belief sich die Zahl der Fehlinjektionen auf höchstens 10%.

Beim Kaninchen wurde ein Injektionsvolum von 2,0 ccm gewählt. Der direkten Auswertung wurden unterzogen:

a) *Bouillonkulturen* von *Shigastämmen*, nach verschieden langer Bebrütungsdauer durch *Reichelfilter filtriert*; die Filtrate, mit *Toluol* versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt, gelangten entweder bald nach der Herstellung oder nach längerer Konservierungsdauer zur Verwendung, worüber die Protokolle jeweils informieren.

b) Ein von *Dumas* (Institut Pasteur) freundlichst überlassenes Natriumsulfat-Trockentoxin von folgender Darstellungsart [*Rowland*[1])]: Von 50 *Roux*schen Schalen werden nach 24—48stündigem Aufenthalt bei 37° C die Bakterien gesammelt und in physiolog. NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Nach dem Zentrifugieren wird dekantiert und das aus Bacillen bestehende Sediment in einer Kältemischung zum Gefrieren gebracht. Die gefrorene Masse läßt sich leicht und ohne Verluste aus dem Zentrifugenröhrchen herausschütteln, wird aufgetaut, gewogen und mit dem $1^1/_2$fachen Gewicht Na_2SO_4 (wasserfrei) versetzt. Infolge der Wasserbindung durch das Na_2SO_4 erstarrt sie, wird im Mörser zerstoßen und als Pulver (vor Feuchtigkeit geschützt) aufbewahrt. Vor der Injektion fügt man zu 0,5 g dieses Pulvers 20 ccm destilliertes Wasser hinzu, läßt 24 Stunden in der Kälte stehen und passiert nach der *Nicolle*schen Methode[2]) durch Infusorienerde.

a) Bouillonkulturfiltrate.

I. 7tägige Bouillonkultur des *Stammes Nr. 141 Wien*. Filtriert und toluolisiert. Prüfung 3 Tage nach der Herstellung:

Kaninchen:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
1	1590	2,0	θ[3])
2	1580	1,0	θ
3	1500	0,75	θ
4	1570	0,5	θ
5	1500	0,25	θ

[1]) Ein auf dem gleichen Prinzip beruhendes Verfahren zur Überführung leicht zersetzlicher wasserhaltiger Substrate (Organbreie, Serum) in trockene haltbare Pulver haben *S. Fränkel* und *A. Elfer* angegeben; *Stökel* benützte es zur Konservierung von Antigenen und Antikörpern.

[2]) Man gibt in ein Reagensgläschen so viel sterile Infusorienerde, daß die runde Kuppe ausgefüllt wird, gießt 20 ccm Wasser dazu, verschließt die Mündung und schüttelt kräftig. Diese Aufschwemmung schüttet man auf ein in einem Glastrichter befindliches Faltenfilter; nach dem Ablaufen des Wassers bedeckt die pulverisierte Infusorienerde gleichmäßig das Papier. Bakterienemulsionen passieren dieses Filter klar.

[3]) θ = „ohne Symptome".

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
	Weiße Mäuse:		
1	16	0,5	θ
2	13	0,5	θ
3	16	0,4	θ
4	14	0,4	θ
5	16	0,3	θ
6	17	0,3	θ
7	16	0,2	θ
8	14	0,2	θ
9	15	0,1	θ
10	17	0,1	θ
11	17	0,05	θ
12	13	0,05	θ

Zum Vergleiche wurde noch ein Kochsalzagarfiltrat hergestellt (2 Agarflaschen mit dem *Stamme „Dys. A"* beimpft, der Rasen in 100 ccm NaCl-Lösung abgeschwemmt; die Emulsion bleibt 24 Stunden bei 37° C, weitere 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, wird dann durch Reichelkerzen filtriert und das Filtrat unter Toluol aufbewahrt). Auswertung nach weiteren 6 Tagen.

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
	Kaninchen:		
69	1720	2,0	θ
70	1760	1,0	θ
71	1700	0,5	θ
72	1690	0,25	θ
	Weiße Mäuse:		
13	14	0,3	θ
14	12	0,2	θ
15	13	0,1	θ
16	12	0,05	θ
17	13	0,01	θ
18	12	0,005	θ

Ist somit ein Bouillonkultur- oder Kochsalzagarfiltrat für Kaninchen atoxisch, so wirkt es auch nicht auf weiße Mäuse; in diesem Verhalten darf man — abgesehen von anderen, noch zu erörternden Momenten — einen Beweis für die Einheitlichkeit des auf beide Tierarten wirkenden Toxins der Shigastämme erblicken.

Unspezifische Wirkungen, wie sie etwa von den genuinen oder veränderten Bouillonbestandteilen, von Stoffwechsel- oder Zerfallsprodukten der Bakterien ausgehen könnten, wurden, von einer bereits erwähnten Ausnahme abgesehen, nicht beobachtet. Man darf daraus zunächst in methodologischer Hinsicht folgern, daß man *nicht* berechtigt ist, irgendwelche Unregelmäßigkeiten in den Auswertungs-

reihen *wirksamer* Dysenteriegiftlösungen, z. B. den auffallend rasch eintretenden Tod bestimmter Versuchstiere oder den unerwartet starken Effekt einer niedrigen Dosis solchen unspezifischen Faktoren zuzuschreiben und die Resultate durch willkürliche Ausmerzung derartiger Fälle zu glätten. Zweitens aber muß es als sehr auffällig bezeichnet werden, *daß man überhaupt ab und zu ungiftige oder fast ungiftige Bouillonkultur- oder Kochsalzagarfiltrate erhält.*

Die Bacillen selbst sind immer toxisch, wovon wir uns durch Injektionen junger Agar- und 3—8stündiger Bouillonkulturen nochmals überzeugt haben. Anderseits gehen in jeder alternden Kultur massenhaft Bakterien zugrunde, von denen man annimmt, daß sie der Auflösung durch Autolyse verfallen und dabei ihre Leibesgifte (Endotoxine) in Lösung übertreten lassen. Wenn beide Voraussetzungen stimmen, versteht man nicht, warum man ungiftige Flüssigkeiten bekommen kann, wenn man eine mehrere Tage alte Bouillonkultur von den Leibern der lebenden und (noch nicht gelösten) toten Bacillen befreit. Ebensowenig besitzt man eine Erklärung dafür, daß die Shigabacillen ihr Gift an das „*Waschwasser*" einmal abgeben, das anderemal nicht. Die Analyse der Erscheinung, über welche an anderer Stelle berichtet werden soll, läßt Einblicke in das noch immer strittige *Verhältnis des Toxins zur Bakterienzelle* erhoffen.

Kehren wir nach dieser Parenthese wieder zu den Toxintitrationen zurück, so sollen zuerst einige Auswertungen *schwächerer, aber frischer Giftbouillonen* Platz finden.

II. *Bouillon*, beimpft mit *Stamm K* (*Wien*). Alter vor der Filtration: 16 Tage; Auswertung 11 Tage nach der Filtration.

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
			Kaninchen:
25	1470	2,0	† nach $1^1/_2$ Tagen; mäßiges Ödem der Cöcalschleimhaut.
49	1410	1,0	† nach 2 Tagen; anatomischer Befund negativ.
26	1460	0,5	Nach 3 Tagen starke Schwäche der Hinterextremitäten, die am 5. Tage schwindet. Erholt sich, *überlebt.*
27	1400	0,25	0
			Weiße Mäuse:
19	16	0,5	† $3^1/_2$ [1])
20	16	0,4	† $3^1/_2$
21	15	0,3	† 3
22	16	0,2	† $7^1/_2$
23	16	0,1	0
24	17	0,075	0
25	16	0,05	0

[1]) Die Ziffer hinter dem † bedeutet Zahl der Tage, welche zwischen Injektion und Exitus verstrichen sind.

III. Bouillon, beimpft mit „*Stamm Saloniki*“. Alter der Bouillonkultur vor der Filtration: 12 Tage. Auswertung 14 Tage nach der Filtration.

Kaninchen:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in mm	Resultat
169	1500	2,0	† 4
170	1670	1,0	θ
171	1450	0,5	θ
172	1650	0,25	θ
		Weiße Mäuse von höherem Körpergewicht:	
26	25	0,2	† $2^1/_2$
27	24	0,1	θ
28	24	0,075	θ
29	24	0,05	† $2^1/_2$
30	24	0,025	θ
31	23	0,01	θ
32	23	0,0075	θ
33	22	0,005	θ
		Weiße Mäuse von niedrigerem Körpergewicht:	
34	15	0,2	† $3^1/_2$. Lähmung der Hinterextremitäten.
35	16	0,1	θ
36	15	0,075	θ
37	15	0,05	θ
38	15	0,025	θ
39	15	0,01	θ
40	15	0,0075	θ
41	15	0,005	θ

IV. Bouillon, beimpft mit *Stamm „Dys. A.“*. Alter der Kultur 12 Tage. Auswertung 4 Tage nach der Filtration.

Kaninchen:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
11	1350	2,0	† $^3/_4$. Anatomischer Befund negativ.
12	1280	1,0	† $1^1/_2$. Anatomischer Befund negativ.
13	1150	0,5	† 1, vorher Paralysen. Anatom. Befund negativ.
14	1200	0,25	θ
15	1200	0,1	θ
		Weiße Mäuse:	
42	15	0,2	† $2^1/_2$
43	13	0,2	† 2
44	16	0,1	† 2
45	17	0,1	† 2
46	17	0,075	† $^3/_4$
47	16	0,075	θ
48	20	0,05	θ
49	20	0,05	θ
50	25	0,025	θ
51	22	0,025	θ
52	23	0,01	θ
53	16	0,01	θ

V. Bouillon, beimpft mit „*Stamm Saloniki*“. Alter der Kultur vor der Filtration: 13 Tage. Auswertung 2 Tage nach der Filtration.

Kaninchen:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
201	1590	2,0	† $^3/_4$. Anatom. negativ.
202	1040	1,0	† $^3/_4$. Andeutung von Cöcalödem.
203	1560	0,75	† $1^1/_2$. Anatom. negativ.
204	1500	0,5	† $1^1/_2$. Cöcalödem, eine Schleimhauthämorrhagie.
205	1220	0,25	† $1^1/_2$, vorher Paresen der vorderen Extremitäten. Anatom. negativ.
206	1570	0,1	Nach 4 Tagen Paraparesis anterior, nach 6 Tagen erholt, überlebt dauernd.

Weiße Mäuse:

54	18	0,5	† $3^3/_4$
55	17	0,4	† $3^1/_2$
56	17	0,4	† $3^1/_2$
57	17	0,3	† 4
58	15	0,2	† 4
59	15	0,1	† $2^1/_2$
60	15	0,1	† $9^1/_2$
61	15	0,075	θ
62	18	0,05	θ
63	15	0,05	θ
64	18	0,025	θ
65	18	0,025	θ
66	14	0,01	θ
67	14	0,01	θ

Um die Reproduzierbarkeit dieser Reihen festzustellen, wurde dasselbe Toxin 4 Tage später nochmals titriert:

Kaninchen:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
24	1700	2,0	† 1. Mäßiges Cöcalödem, vereinzelte Hämorrhagien der Blinddarmschleimhaut.
28	1710	1,0	† $1^1/_4$. Starkes Cöcalödem.
29	1770	0,75	† $7^1/_2$ nach langdauernden Lähmungen der Hinterextremitäten. Starkes Cöcalödem, ausgedehnte Hämorrhagien, im Magen 2 Geschwüre und zahlreiche schwarze Erosionen.
30	1750	0,5	† $^3/_4$. Starkes Cöcalödem.
31	1700	0,25	† 3. Nach 24 St. schwere Lähmungen der vorderen und hinteren Extremitäten; das Tier lag lange auf der Seite. Deutl. Cöcalödem.
32	1730	0,1	† $3^1/_2$. Nach 2 Tagen Lähmungen, lag auf der Seite. Deutliches Cöcalödem.
33	1570	0,075	Nach 4 Tagen leichte Paresen, erholt sich, überlebt dauernd.
34	1500	0,05	θ

Weiße Mäuse:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
68	18	0,5	† $2^1/_2$
69	17	0,4	† $4^1/_2$
70	18	0,3	† 2
71	17	0,2	† $3^1/_2$
72	15	0,1	† $6^1/_2$, am 5. Tage Lähmungen.
73	15	0,075	† $12^1/_2$
74	15	0,05	θ
75	18	0,025	θ
76	14	0,01	† $8^1/_2$

Aus diesen, *mit relativ schwachen* Giftlösungen erzielten Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ableiten, die, wie noch gezeigt werden soll, auch *für starke Shigatoxine* ihre Gültigkeit bewahren:

1. Die durch intravenöse Injektion fallender Giftmengen gewonnenen Reihen weisen sowohl bei Kaninchen wie bei weißen Mäusen eine den prüfungstechnischen Ansprüchen genügende Regelmäßigkeit auf. „*Individuelle Schwankungen*" der Giftempfindlichkeit kommen bei beiden Tierarten vor; bei der weißen Maus sind sie etwas stärker ausgeprägt (Nr. 29, 76), lassen sich aber durch eine größere Zahl von Versuchstieren ohne weiteres ausgleichen.

2. Die *Dosis letalis minima* eignet sich weder bei Kaninchen noch bei Mäusen als Maßeinheit. Es kommt eben immer wieder vor, daß mitten im Bereiche der unwirksamen Dosen ein Tier (Mäuse Nr. 29 und 76) mit Exitus reagiert, den man nicht irgendwelchen akzidentellen Einflüssen zur Last legen kann, da sich in solchen Fällen oft genug typische Symptome oder charakteristische anatomische Veränderungen (Paraplegien, Cöcalläsionen) konstatieren lassen.

3. Eine brauchbare Einheit stellt die *Dosis „certe letalis"* dar, obzwar auch hier hinsichtlich der weißen Maus noch ein später zu erörternder Vorbehalt gemacht werden muß.

4. Eine Verwertung *der bis zum Tode verstreichenden Zeit* als Maß der Toxizität erscheint vollkommen ausgeschlossen. Im allgemeinen wird das Intervall zwischen Giftinjektion und Exitus allerdings mit fallender Dosis verlängert (vgl. z. B. die Kaninchen 201 bis 206 oder die Mäuse 70—73); aber die Abweichungen von diesem Gesetz sind so zahlreich und so bedeutend, daß die Einbeziehung der „Todeszeit" in die Definition der Dosis letalis (*Fukuhara*) unmöglich wird.

5. Die Todeszeit ist bei der weißen Maus erheblich länger als beim Kaninchen. Diese Wahrnehmung haben bereits *Sachs* und *Georgi* gemacht. Da diese Autoren den Tod der Mäuse auch bei einem erheblichen Multiplum der tödlichen Dosis in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle nicht früher als nach 36—48 Stunden eintreten sahen, tragen sie Bedenken, den schon nach „Ablauf eines Tages" eingetretenen Tod auf die

reine Toxinwirkung zurückzuführen. Sie machen für solche Frühtodesfälle interkurrente Ursachen oder bestehende pathologische Zustände, welche durch die Gifteinspritzung verstärkt werden, verantwortlich. Dieser Auffassung kann man sich jedoch nicht ohne weiteres anschließen.

Vor allem deshalb, weil sich mit steigender Giftdosis bei der Maus (wie beim Kaninchen) die Todeszeit verkürzt (vgl. Punkt 4), und *weil sich die Frühtode im Bereiche der 10—50 fachen letalen Dosen beträchtlich häufen* (siehe die Experimente über die Wirkung hoher Multipla). Dann beobachtet man zuweilen vor einem solchen vorzeitigen Exitus evidente spezifische Toxinwirkungen (Paresen oder selbst beiderseitige Paralysen). Und schließlich finden die Frühtode der Toxinmäuse ihr Gegenstück beim Kaninchen; nur sind die Todeszeiten bei dieser Tierart noch wesentlich geringer und können auf 6—10 Stunden herabsinken. Eine untere Grenze, unterhalb welcher der Exitus nicht mehr auf das Toxin bezogen werden darf, läßt sich sehr schwer fixieren; wenn man sich vorstellt, daß die Frühtode auf einer besonderen Lokalisation des neurotropen Giftes in wichtigen Nervenzentren (Medulla oblongata) beruhen, so kann die Todeszeit — vom theoretischen Standpunkt beurteilt — jenem Intervalle als Minimum zustreben, welches zur Bindung des Toxins an die betreffenden Zellen erforderlich ist, könnte also sehr kurz werden. Da dieses Intervall derzeit unbekannt ist, ist man auf Schätzungen angewiesen; vielleicht greift man nicht sehr daneben, wenn man für das Kaninchen 6, für die Maus 18 Stunden ansetzt.

Aber darüber kann kein Zweifel bestehen, daß die minimalen Todeszeiten bei der Maus bedeutend (ca. dreimal) länger sind als beim Kaninchen, und wir dürfen daraus mit großer Wahrscheinlichkeit folgern, daß auch die Bindungszeiten des Giftes an die Organe in ähnlicher Weise differieren. Das läßt sich in der Tat auf einem anderen Wege (s. w. u.) experimentell erhärten.

Die sicher letalen Dosen betrugen:

	für Kaninchen ccm	pro Gramm ccm	für Mäuse ccm	pro Gramm ccm
Filtrat III	2,0	0,0013	0,2	0,0133
Filtrat II	1,0	0,0007	0,2	0,0125
Filtrat IV	0,5	0,0004	0,1	0,0062
Filtrat V	$<0{,}25$	$<0{,}0002$	0,1	0,0066

Nach diesen Ergebnissen zu schließen, wäre die Maus (auf das Gramm Körpergewicht umgerechnet) etwa 10—15 mal weniger empfindlich als das Kaninchen; doch ist das Verhältnis nicht immer das gleiche.

Gehen wir nun zu den Filtraten *mit starker Toxizität* über.

VI. Bouillon, beimpft mit „*Stamm Dys. A.*“. Alter der Kultur vor der Filtration 12 Tage. Auswertung 24 Stunden nach der Filtration.

Kaninchen:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
7	1650	1,0	† $^3/_4$. Anatomischer Befund negativ.
8	1800	0,75	† $^3/_4$. Anatomischer Befund negativ.
6	1500	0,5	† 1. Anatomischer Befund negativ.
9	1700	0,25	† $1^1/_2$. Anatomischer Befund negativ.
17	1550	0,25	† $1^1/_2$. Anatomischer Befund negativ.
39	1800	0,25	† $2^1/_2$. Mäßiges Darmödem. Starke Injektion der visceralen Serosa.
18	1700	0,25	† $2^1/_2$. Am 2. Tage rechtsseitige Lähmung. Mächtiges subseröses und submuköses Cöcalödem, einzelne Schleimhauthämorrhagien.
10	1770	0,1	Am 2. Tage Paresen der vorderen, am 3. Tage der hinteren Extremitäten. Liegt auf der Seite, nimmt aber reichlich Nahrung. Dieser Zustand dauert 4 Tage, dann setzt sich das Tier auf und hüpft umher. Am 8. Tage Lähmungsrezidiv. † $8^1/_2$. Cöcalödem, Schleimhauthämorrhagien.

Leider wurde die Reihe nicht fortgesetzt; ob mit 0,1 ccm die Grenze erreicht war, muß daher dahingestellt bleiben.

Weiße Mäuse:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
77	14	0,5	† $1^1/_2$
78	16	0,5	† $2^1/_2$
79	13	0,4	† $2^1/_2$
80	15	0,4	† 4
81	15	0,3	† $2^1/_2$, vorher starke Lähmungen.
82	14	0,3	Nach $2^1/_2$ Tagen starke Lähmung beider Hinterextremitäten, *die bis zum 5. Tage zurückgeht, überlebt dauernd.*
83	14	0,2	† $2^1/_2$
84	15	0,2	† $3^3/_4$, vorher Lähmungen.
85	15	0,2	† $2^1/_2$
86	15	0,1	† $^3/_4$
87	16	0,1	† 3
88	14	0,1	θ
89	15	0,075	† 3
90	13	0,05	† 4. Vorher Lähmungen.
91	15	0,05	† $2^1/_2$, verendet 2 St. nach einem ausgelösten Krampfanfall.
92	16	0,05	† $3^1/_2$
93	15	0,025	† $2^1/_2$
94	16	0,01	θ
95	16	0,01	θ

Als sicher letale Dosis würde sich *0,025* ergeben, wenn nicht 88 auf die 4fache Menge gar nicht, 82 auf das 12fache Multiplum mit ausheilenden Lähmungen reagiert hätten. Es wurde daher eine zweite

Serie angesetzt, und zwar mit *größeren Mäusen*, da das Körpergewicht auf die Toxinempfindlichkeit so gut wie gar keinen Einfluß zu haben schien (vgl. die Mäuse 26—41) und man andererseits erwarten konnte, daß irgendwelche Zufallsmomente bei erwachsenen, widerstandsfähigeren Tieren weniger in die Wagschale fallen würden.

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
96	24	0,2	† $3^1/_2$
97	27	0,2	θ
98	25	0,1	θ
99	25	0,1	θ
100	26	0,075	θ
101	15	0,075	† $2^3/_4$
102	25	0,05	θ
103	23	0,05	θ
104	27	0,025	θ
105	23	0,025	θ
106	22	0,01	θ
107	24	0,01	θ

Diese Häufung von Versagern haben wir nie mehr wieder beobachtet und können für die Erscheinung keine plausible Erklärung abgeben. Auffällig bleibt allerdings, daß die einzige Maus von geringem Gewichte (Nr. 101) typisch reagierte; aber andere Toxinbouillonen wirkten auf Mäuse von 25 g nicht wesentlich anders als auf solche von 15 g. Die dritte Auswertungsserie an Tieren von 15 g lieferte wieder das gewohnte Bild.

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
108	15	0,2	† $2^1/_2$
109	16	0,1	† $3^1/_4$
110	15	0,075	† $3^1/_4$
111	16	0,05	† $2^1/_2$
112	15	0,025	† $3^1/_2$
113	16	0,01	θ
114	16	0,01	θ

VII. Bouillon beimpft mit Stamm „Dys.A". Alter der Kultur: 22 Tage. Auswertung 7 Tage nach der Filtration.

Kaninchen:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
161	2190	0,5	† $^3/_4$. Anatomischer Befund negativ.
605	1870	0,4	† 1. Cöcalödem. Schwerste Veränderungen der Schleimhaut, hämorrhagische Infarcierung, Nekrosen.
682	2000	0,4	† $1^1/_4$. Enormes Cöcalödem. Schleimhaut hämorrhagisch infarciert, Epithel nekrotisch.
683	2050	0,4	† $3^1/_2$. Kein Ödem. Schleimhaut hämorrhagisch infarciert, Epithel nekrotisch.
684	2100	0,4	† $1^1/_2$. Starkes Ödem. Keine Hämorrhagien, keine Nekrosen.

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
685	2350	0,4	† 3/4. Anatomischer Befund negativ.
686	2100	0,4	† 3/4. Starkes Ödem, vereinzelte Schleimhautpetechien.
687	2390	0,4	† 3/4. Starkes Cöcalödem, keine Hämorrhagien.
615	1950	0,4	† 3/4 wie Nr. 687.
167	1200	0,25	† 3/4. Anatomischer Befund negativ.
614	1517	0,2	† 2. Stärkstes Cöcalödem.
160	2130	0,2	† 3/4. Befund negativ.
159	2160	0,1	† 2 1/2. Befund negativ.
162	1950	0,1	† 2. Ödem und Hyperämie des Coecums.
166	1300	0,1	† 1. Befund negativ.
613	1550	0,1	† 1 3/4. Befund negativ.
171	1220	0,075	† 1 1/2. Befund negativ.
165	1180	0,05	† 3/4. Befund negativ.
170	1225	0,05	† 3 1/2. Starkes Cöcalödem.
612	2040	0,05	† 4
608	1520	0,05	† 3/4. Hyperämie des Coecums.
169	1220	0,025	0
164	1600	0,025	† 2 3/4. Cöcalödem, Hämorrhagie der Schleimhaut.
168	1300	0,01	0
670	1650	0,01	0
			Weiße Mäuse:
115	14	0,1	† 1 1/2
116	14	0,075	† 3, vorher Paralysen.
117	14	0,05	† 3, vorher Paralysen.
118	14	0,025	† 3 1/2, vorher Paralysen.
119	14	0,025	† 4 1/2, vorher Paralysen.
120	14	0,01	† 3, vorher Paralysen.
121	14	0,005	0
122	14	0,005	0
123	13	0,0025	0
124	13	0,0025	0
125	13	0,001	0
126	13	0,001	0

VIII. Dasselbe Bouillonkulturfiltrat wie sub VII, *aber ein volles Jahr nach der Filtration und Toluolisierung.*

Kaninchen:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
706	1660	0,5	† 1 1/2. Cöcalödem.
707	1610	0,25	† 1/2. Befund negativ.
715	1675	0,25	† 1 1/4. Schwaches Cöcalödem.
701	1590	0,1	† 2 1/2, vorher Paralysen. Starkes Cöcalödem.
714	1675	0,1	Am 2. Tag komplette Lähmung der vorderen Extremitäten, erholt sich und *überlebt.*
702	1610	0,05	† 2 1/4, mäßiges Cöcalödem.
716	1500	0,025	0
717	1700	0,01	0

Eine Abschwächung für Kaninchen war somit offenbar nicht erfolgt, und es war anzunehmen, daß sich auch die Toxizität für weiße Mäuse in den früher ermittelten Grenzen (Dosis letalis für 15 g Mausgewicht = 0,01 ccm) halten würde. Die Verifizierung dieser Vermutung gelang aber nicht ohne Aufwand von Tieren und Zeit. Die erste Serie ergab folgendes Resultat:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
127	17	0,1	† 2, vorher Lähmung.
128	17	0,1	† 1
129	17	0,075	† $^1/_2$
130	17	0,05	† 1
131	17	0,025	† $1^1/_2$
132	17	0,025	† $3^1/_2$, vorher Lähmung.
133	17	0,01	† $^3/_4$
134	17	0,01	† $5^1/_2$
135	17	0,005	† 5

Die Wiederholung (mit kleinen Abänderungen) wich in mehrfacher Beziehung, vor allem auch hinsichtlich der Todeszeiten ab, brachte aber keine Entscheidung.

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
136	22	0,1	† $2^1/_2$
137	22	0,1	† $2^1/_2$, vorher Lähmungen.
138	22	0,075	† $2^1/_2$, vorher Lähmungen.
139	22	0,075	† $2^1/_2$, vorher Lähmungen.
140	22	0,05	† 3, vorher Lähmungen.
141	22	0,05	† $2^1/_2$, vorher Lähmungen.
142	22	0,025	† $1^1/_2$
143	22	0,025	† $5^1/_2$ vorher starke Lähmung.
144	22	0,01	† $7^1/_2$ vorher starke Lähmung.
145	22	0,01	† $6^1/_2$
146	20	0,005	0
147	20	0,005	† 7 vorher Lähmungen.

Die Zunahme der Todeszeiten von 0,025 an ließ allerdings vermuten, daß die Dosis letalis nicht viel unter 0,01 liegen kann; es mußte aber doch noch eine Titration angeschlossen werden, und diese lieferte dann de facto den bezeichneten Grenzwert:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
148	15	0,01	† 4, vorher Lähmungen.
149	15	0,075	0
150	15	0,005	0
151	15	0,0025	Am 6. Tag Lähm., die am 8. Tage zurückgehen.
152	15	0,001	0
153	15	0,001	† $4^1/_2$, vorher Lähmungen.

Es wurden mit dieser Toxinlösung im Laufe von ca. 6 Wochen sehr viele Versuchsreihen angesetzt und am Ende dieses Zeitraumes noch-

mals eine Bestimmung vorgenommen, welche zeigte, daß die Giftigkeit keine Reduktion erfahren hatte. Eine *Zusammenstellung aller Einzelergebnisse* bietet ganz besonderes Interesse, weil sie über die Verläßlichkeit der Maus als Reagens auf Dysenterietoxin, über die Todeszeiten nach hohen Multipla und manche andere Punkte unterrichtet.

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
154	15	0,5	† $1^1/_2$
155	15	0,5	† 2, vorher Lähmungen.
156	15	0,4	† $^3/_4$
157	16	0,4	† $^3/_4$
158	16	0,3	† $^3/_4$
159	16	0,3	† $^3/_4$, vorher Lähmungen.
160	16	0,2	† $1^1/_2$
161	18	0,2	† 2, vorher Lähmungen.
162	13	0,1	† 3, vorher Lähmungen.
163	14	0,1	† $2^3/_4$, vorher Lähmungen.
164	18	0,1	† $2^1/_2$
165	18	0,1	θ
166	18	0,1	† $2^1/_2$, vorher Lähmung.
167	17	0,1	† $2^1/_4$, vorher Lähmung.
168	17	0,1	† $2^1/_4$ im ausgelösten Anfall.
169	16	0,1	† $1^1/_2$ (Struma).
170	16	0,1	θ
171	15	0,1	† 2 im Anfall.
172	15	0,1	† $2^1/_4$
173	16	0,1	† $1^1/_2$, Anfall.
174	15	0,1	† $1^1/_2$, Anfall.
175	16	0,1	† $1^1/_2$
176	16	0,1	† $3^1/_2$, vorher Lähmung.
177	16	0,1	† $3^1/_2$, vorher Lähmung.
178	15	0,1	† $1^1/_2$, vorher Lähmung.
179	15	0,1	θ
129	17	0,075	† $^1/_2$
138	22	0,075	† $2^1/_2$
139	22	0,075	† $2^1/_2$
130	17	0,05	† 1
140	22	0,05	† 3, vorher Lähmung.
141	22	0,05	† $2^1/_2$, vorher Lähmung.
131	17	0,025	† $1^1/_2$
132	17	0,025	† $3^1/_2$, vorher Lähmung.
142	22	0,025	† $1^1/_2$
143	22	0,025	† $5^1/_2$, vorher Lähmung.
133	17	0,01	† $^3/_4$
134	17	0,01	† $5^1/_2$
144	22	0,01	† $7^1/_2$, vorher Lähmung.
145	22	0,01	† $6^1/_2$
148	15	0,01	† 4, vorher Lähmung.
180	16	0,01	† 1
181	16	0,01	† $6^1/_2$, vorher Lähmungen.
182	16	0,01	† $7^1/_2$, vorher Lähmungen.

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
183	16	0,0075	† 1
184	16	0,005	θ
185	16	0,005	† $1^1/_2$
186	16	0,005	† 7
135	17	0,005	† 5
150	15	0,005	θ
146	20	0,005	θ
147	20	0,005	† $6^1/_2$
151	15	0,0025	Am 6. Tag Lähmungen, die am 8. Tage zurückgehen, überlebt.
187	16	0,0025	† $6^1/_2$
152	15	0,001	θ
153	15	0,001	† $4^1/_2$, vorher Lähmungen.

Wir sind nunmehr in der Lage, die aus den Titrationen schwacher Giftbouillons gezogenen Schlußfolgerungen in einigen Punkten zu ergänzen, in den meisten Beziehungen aber vollinhaltlich zu bestätigen.

So findet man für die Unmöglichkeit, die *Dosis letalis minima* als Maßeinheit zu verwenden, außerordentlich zahlreiche Belege, sowohl für das Kaninchen (Nr. 169 und 164) als auch für die weiße Maus (82, 88, 89, 101, 147, 153, 184—186, 135, 150, 146, 147, 187, 153). Führt man die direkte Giftbestimmung an relativ wenigen Tieren aus, so markiert sich oft genug eine sehr *scharf gezogene Grenze*, so daß man gar nicht in Zweifel gerät, welche Giftmenge eben noch den Tod als Intoxikationsfolge nach sich zieht (siehe z. B. die Serien 108—114 und 115—126). Der gefundene Wert entspricht aber in solchen Fällen meist gar nicht der Dosis minima, sondern der Dosis certe letalis, und die scharfe Abgrenzung letaler und nicht letaler Giftmengen ist ein *Zufallsprodukt*, wie die Betrachtung anderer Serien (136—147, 148—153) und vornehmlich ausreichend große, die gleichen Dosen mehrfach wiederholende Reihen erkennen lassen.

Auch die *Dosis certe letalis* ist übrigens nicht immer leicht zu fixieren. Beim Kaninchen hatten wir freilich keine erheblichen Schwierigkeiten. Das Versagen hoher Giftmengen (*Sachs* und *Georgi*) konnte *auch nicht ein einziges Mal* beobachtet werden und das Abwechseln von Glattbleiben, ausheilenden Symptomen und Tod infolge von spezifischer Dysenterietoxinwirkung stellte sich stets erst in einem Bereich ein, welches zwanglos als das Intervall zwischen Dosis certe letalis und Dosis let. minima angesehen werden durfte. Ebensowenig trat jemals der Fall ein, daß mittlere Giftmengen ein Optimum des Effektes ergaben, und daß ein Abweichen von diesem optimalen Werte (sei es nun nach oben oder nach unten) eine Abschwächung der Intoxikation bedingte (*Sachs* und *Georgi*).

Dagegen waren bei der Maus Multipla einer sonst ganz regelmäßig letalen Toxindosis manchmal völlig unwirksam. Als letale Dosis für das sub VII und VIII beschriebene Filtrat darf man wohl 0,01 ccm

ansetzen; die Mäuse 165, 170, 179 und noch ein weiteres, im Protokoll nicht angeführtes Tier (200) reagierten aber auf 0,1 ccm intravenös gar nicht, und für das Filtrat VI repräsentieren Nr. 82 und 88 analoge Vorkommnisse, deren Einfluß auf die Beurteilung von Serumauswertungen mit zugehörigen Toxinkontrollen nicht erst auseinandergesetzt zu werden braucht.

Hohe Multipla der einfach letalen Dosis können bei der weißen Maus die Todeszeit auf ca. 18 Stunden herabdrücken; doch machen sich auch hier individuelle Einflüsse geltend (154—161).

Die letalen Dosen betrugen:

	für Kaninchen	pro Gramm	für Mäuse	pro Gramm
Filtrat VI	0,1	0,000056	0,025	0,00166
Filtrat VII	0,05	0,00003	0,01	0,00066

d. h. das Kaninchen war (pro Gramm gerechnet) für diese starken Toxine 22—29 mal empfindlicher als die weiße Maus.

Endlich muß man einräumen, daß die Wirkungen, welche das Filtrat VII bei Kaninchen hatte, mit der Annahme einer komplexen Struktur des Shigatoxins, speziell einem *Aufbau aus Neuro- und Enterotoxin nicht in Einklang zu bringen sind.* Zwischen 0,025 und 0,5 ccm vermochte jede Dosis Darmveränderungen und nervöse Störungen auszulösen, und ebenso konnten Nervensymptome oder Cöcalbefund bei jeder Dosis fehlen; und da auch die „Todeszeit" für das Ausbleiben der toxischen Cöcaldysenterie nicht verantwortlich zu machen war (vgl. Kan. Nr. 161, 685, 686, 687, 615, 159), so erübrigt eben nur die Erklärung, daß es sich um ein einziges, mit Affinitäten zu verschiedenen Geweben ausgestattetes Gift handelt.

b) Natriumsulfat-Trockentoxin.

Kaninchen:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
729	1620	0,75	† $^3/_4$, vorher Diarrhöen, Anat. negativ.
730	1570	0,5	† $1^1/_4$, Paresen. Befund negativ.
731	1600	0,25	† $3^1/_2$, schwerste Lähmungen.
732	1490	0,125	† $4^1/_2$, schwerste Lähmungen. Befund wie bei 731 negativ.
733	1440	0,1	† 2, schwerste Lähmungen, Befund negativ.
734	1600	0,1	† $8^1/_2$, schwerste Lähmungen, Diarrhöen, Befund negativ.
735	1480	0,05	† 2, Lähmungen, Befund negativ.
736	1370	0,05	† $5^1/_2$, starke Lähmung, Befund negativ.
737	1410	0,025	θ
738	1370	0,01	θ

Die Giftigkeit für Kaninchen entsprach also jener des Bouillonkulturfiltrates Nr. VII; es konnte nur auffallen, daß *keines der Kaninchen bei der Obduktion einen ausgeprägten anatomischen Darmbefund* aufwies, obwohl im Falle der Richtigkeit der Hypothese von *Olitsky* und *Kligler*

das Gegenteil zu erwarten war, da ja die Leibessubstanzen („Endotoxine") zufolge der Darstellungsart einen integrierenden Bestandteil der ausgewerteten Giftlösung bilden mußten. In dieser Beziehung bot auch die Feststellung der Mäusetoxizität besonderes Interesse. *Olitsky* und *Kligler* schließen aus dem Vorherrschen nervöser oder enteraler Symptome bzw. aus der Kombination der beiden Erscheinungsgruppen, ob eine bestimmte Giftlösung nur das neurotrope Exotoxin oder bloß das enterotrope Endotoxin oder ein Gemenge der beiden hypothetischen Fraktionen enthält. Von diesem Standpunkt aus darf man auf Grund der wiedergegebenen Resultate zweifellos Filtrat VII als vorwiegend „enterotoxisch", die aus dem Trockentoxin gewonnene Lösung als „neurotoxisch" klassifizieren. Dann aber gerät man bereits in Verlegenheit, wie man den *gleichen* Toxizitätsgrad der zwei Giftsolutionen für Kaninchen erklären soll, und noch schwieriger würde die Situation, wenn es sich herausstellen sollte, daß auch die Wirkungen auf die weiße Maus identisch sind. Das ist tatsächlich der Fall. Allerdings bedurfte es wieder eines größeren Tieraufwandes, bevor die Dosis letalis mit der gewünschten Sicherheit eruiert war.

Die ersten 3 Auswertungen (in eine Tabelle zusammengefaßt) ergaben:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
190	15	0,1	† $2^1/_2$
191	15	0,05	† $2^1/_2$
192	15	0,025	† $2^1/_4$
193	15	0,025	† $2^1/_4$
194	15	0,02	† 1
195	15	0,01	† $^3/_4$
196	15	0,01	† 2
197	15	0,0075	† $1^1/_2$
198	15	0,0075	† $2^1/_2$
199	15	0,005	θ
220	15	0,005	† 1
221	15	0,0025	θ
222	15	0,001	† $2^1/_4$

Die Entscheidung brachte dann folgende Serie:

223	16	0,01	† $4^1/_2$ im Anfall, vorher Lähmungen.
224	16	0,01	† $3^3/_4$
225	16	0,01	† 3 im Anfall.
226	16	0,01	† 3
227	16	0,0075	θ
228	16	0,0075	θ
229	16	0,0075	θ
230	16	0,0075	θ
231	16	0,005	θ
232	16	0,005	θ
233	16	0,005	θ
234	16	0,005	θ

0,01 *ccm* war somit die letale Dosis; doch kann die ungewöhnlich scharfe Grenze in der letzten Reihe (223—234) zweifellos nur als zufällig angesehen werden.

Mit demselben Gift wurden versuchsweise auch subcutane und intraperitoneale Injektionen vorgenommen:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm subcutan	Resultat
235	14	0,15	† 2
236	14	0,125	† 3
237	14	0,12	† 4, vorher Lähmung.
238	14	0,1	† $2^1/_2$
239	15	0,1	† $1^1/_2$
240	14	0,1	† 4
241	14	0,08	† $2^1/_2$
242	14	0,075	† 2
243	14	0,06	† $1^1/_2$
244	14	0,05	† $2^1/_2$
245	15	0,05	† $1^1/_2$
246	14	0,05	0
247	15	0,025	† 4, vorher Lähmung.
248	14	0,025	0
		intraperitoneal	
249	14	0,1	† $2^3/_4$
250	14	0,08	† $2^1/_2$
251	14	0,075	† $3^1/_2$
252	14	0,06	0
253	14	0,05	† $1^1/_2$
254	14	0,05	† $4^1/_2$
255	14	0,04	Lähmung, erholt sich.
256	14	0,025	† $1^1/_2$
257	14	0,025	0
258	14	0,02	† $1^1/_2$
259	14	0,02	0
260	14	0,01	† $1^1/_2$
261	14	0,01	† $1^1/_2$
262	14	0,005	0

Die intravenöse Injektion wirkt also stärker und macht die Resultate regelmäßiger.

II. Zur Haltbarkeit der Bouillonkulturfiltrate unter Toluol.

4 Filtrate waren im Januar 1922 hergestellt worden und standen ein Jahr lang unter Toluol im Kühlschrank (+ 4° C), einmal infolge eines Versehens 14 Tage bei Zimmertemperatur.

Die Dosis letalis wurde zu Beginn und am Ende der Konservierungsperiode möglichst genau ermittelt und betrug für Kaninchen von ca. 1500 und für Mäuse von 15 g Körpergewicht:

	für Kaninchen		*für Mäuse*	
	frisch	nach 1 Jahr	frisch	nach 1 Jahr
Filtrat I (identisch mit dem ausführlich beschrieb. Filtrat VII resp. VIII)	0,05 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm	0,1 ccm
Filtrat II	0,05 „	0,25 „	0,01 „	0,2 „
Filtrat III	0,25 „	0,25 „	0,075 „	0,15 „ (?)
Filtrat IV	0,5 „	0,5 „	0,2 „	0,2 „

Zwei Filtrate hielten sich unverändert (I und IV), und zwar ein hochtoxisches (I) und eines von 10—20 mal geringerer Giftigkeit (IV), so daß dieser Unterschied für die Stabilität der Shigatoxine irrelevant zu sein scheint.

Filtrat II ging auf ein Fünftel des ursprünglichen Wertes zurück; die Toxizität sank für Kaninchen im gleichen Maße wie für weiße Mäuse, ein neues Argument zugunsten der Auffassung, daß das Shigatoxin eine einheitliche Zusammensetzung hat, als chemisches Individuum gelten darf. Die rasche und relativ starke Deteriorierung dieses Filtrates mag übrigens ein akzidenteller Faktor verschuldet haben. Der Kulturkolben wurde nämlich nach Ablauf der Bebrütungszeit geöffnet, sein Inhalt jedoch nicht sofort, sondern erst nach 4tägigem Stehen bei 12° C (Kellerlokal!) filtriert. Das Filtrat fluorescierte sehr stark blaugrün, fast wie Petroleum, so daß eine Verunreinigung durch ein farbstoffbildendes Bakterium, dessen effektiver Nachweis leider nicht mehr geführt werden konnte, wahrscheinlich wurde; möglicherweise hatte der verunreinigende Keim abbauende Fermente an die Bouillon abgegeben, welche das Shigatoxin partiell in atoxische Derivate überführten.

Bei Filtrat III war die Kaninchentoxizität nach einjährigem Stehen unter Toluol die gleiche; die Giftigkeit für Mäuse hatte vielleicht eine kleine Reduktion erfahren, vielleicht war sie ebenfalls unverändert. Ein absolut sicheres Urteil erlaubten die Auswertungen, obwohl mit Tieren nicht gerade gespart wurde, nicht, und da gerade hier die direkte Bestimmung der Giftigkeit dazu dienen sollte, um eine andere Frage zu lösen, um also einen vorgelegten Fall zu entscheiden, bieten die Details der Versuchsreihen ein gewisses Interesse.

Titration von Filtrat III an intravenös injizierten Mäusen.

Frisch				Nach einjährigem Stehen		
Nr.	Gewicht in g	Resultat	Injektionsdosis in ccm	Nr.	Gewicht in g	Resultat
270	18	† $1^1/_2$	0,4	290	15	† $2^1/_4$
271	18	† $3^1/_2$	0,2	291	15	† $2^1/_4$
			0,2	292	15	† 3
			0,2	293	15	0
			0,15	294	15	† $2^1/_2$
			0,15	295	15	† 3

Frisch				Nach einjährigem Stehen		
Nr.	Gewicht in g	Resultat	Injektionsdosis in ccm	Nr.	Gewicht in g	Resultat
272	18	†11	0,1	296	15	† $10^1/_2$
273	18	† 3	0,1	297	15	θ
274	18	† 3	0,1	298	15	Lähmungen, überlebt.
275	18	† $2^1/_2$	0,075	299	15	θ
276	18	θ	0,05	300	15	θ
277	18	θ	0,05	301	15	Lähmungen, überlebt.
			0,05	302	15	wie 301.
278	18	θ	0,025	303	15	θ
279	18	θ	0,01	304	15	θ

Wie schon *Kraus* und *Doerr* angaben, sind — nach vorstehenden Befunden zu urteilen — die toxischen Bouillonkulturfiltrate der Shigastämme ziemlich resistent und die entgegengesetzten Behauptungen vielleicht darauf zurückzuführen, daß man bei der Herstellung der Giftlösungen die Bakterienleiber in der Regel gar nicht abfiltriert, sondern in der Bouillon beläßt, die noch lebenden Exemplare mit Toluol abtötet und die Klärung der Flüssigkeit durch spontane Sedimentierung abwartet (*Kolle*). Braucht man große Toxinquanten z. B. zur Immunisierung von Pferden, so wird dieses Verfahren sicher praktische Vorteile bieten; für Auswertungszwecke wären dagegen die keimfreien Filtrate schon aus theoretischen Gründen mehr zu empfehlen.

Übertragbare Lysine kommen als gelegentliche Ursachen eines raschen Toxinabbaues nicht in Betracht, wie *Doerr* und *Zdansky* in einer demnächst erscheinenden Mitteilung nachweisen.

III. Intravenöse Injektionen von Toxin-Antitoxin-Gemischen ausgeführt an Kaninchen und an weißen Mäusen.

Will man den reinen Neutralisationswert antitoxischer Sera ermitteln, so verfährt man bekanntlich im Prinzip so, daß man ein bestimmtes Multiplum der letalen Dosis eines Testgiftes mit fallenden Mengen des zu prüfenden Serums versetzt, die zur Bindung von Toxin und Antitoxin erforderliche Zeit abwartet und die Gemenge den giftempfindlichen Tieren einspritzt.

Weder die Höhe des Multiplums der letalen Testgiftdosis noch die Bindungszeit sind irrelevant. *Doerr* ist auf Grund ziemlich ausgedehnter Versuche dafür eingetreten, den „Gemischtwert" der Dysenteriesera am Kaninchen mit Hilfe der 10—20fach letalen Giftdosis zu titrieren und die Giftserumgemische bei 37° C durch eine Stunde stehen zu lassen; diese Vorschläge sind nicht nur empirisch begründet, sondern lassen sich auch theoretisch motivieren, und zwar durch die hohe Empfindlichkeit des Kaninchens für Shigagifte und die damit vermutlich zusammenhängende Avidität dieser Toxine zu den Kaninchengeweben.

Weiße Mäuse sind gegen die Shigatoxine weniger empfindlich, wenn man die Dosis letalis auf die Einheit des Körpergewichtes umrechnet; dagegen benötigt man für die tödliche Intoxikation einer weißen Maus von 15 g ca. 5 mal weniger von irgendeiner Giftlösung als für ein Kaninchen von $1^1/_2$ kg, so daß man erwarten könnte, daß die Maus auf knapp unterneutralisierte Gemische ceteris paribus eher resp. stärker reagieren wird. Die Avidität der Shigatoxine zu den Mausgeweben ist — wie noch gezeigt werden soll — relativ gering, so daß die Bindungszeit in vitro nicht so sehr ins Gewicht fällt, da in den ersten Stunden nach der Injektion noch nachträgliche Absättigungen des Giftes im Organismus stattfinden können.

Was die Regelmäßigkeit der Versuchsreihen und ihre Reproduzierbarkeit anlangt, erklärt sich *Doerr*, soweit das Kaninchen als Versuchstier in Frage kommt, befriedigt; es schien uns um so überflüssiger, den genügend zahlreichen und genauen Titrationen dieses Autors neue hinzuzufügen, als *Doerr* mit seiner Auffassung nicht vereinzelt dasteht, sondern in der Lage ist, sich auf eine große Menge übereinstimmender Prüfungsresultate in der älteren und neueren Dysenterieliteratur zu berufen. Natürlich kommt es ab und zu einmal vor, daß ein Kaninchen aus der Reihe herausfällt, oder daß ein Tier, welches ein zweifellos überneutralisiertes Gemisch erhalten hat, infolge irgendeiner sekundären Störung kurz (manchmal schon wenige Minuten nach der intravenösen Injektion) eingeht; dann genügt aber ausnahmslos die Wiederholung der Prüfung dieser bestimmten Giftserummischung, um das in die primäre Serie passende Ergebnis zu erhalten. Ein anderer, schon von *Doerr* betonter Vorzug ist die Reproduzierbarkeit der Auswertungsreihen und die dadurch implizite gegebene Möglichkeit, zwischen weit auseinanderliegenden Werten einer durchgeführten Bestimmung die nötigen Abstufungen nachträglich zu interpolieren. Ein Beispiel mag das illustrieren.

Zwei Sera (Nr. 120 und 200) wurden im Gemischtversuch gegen die 10fach letale Dosis eines bestimmten Giftes (0,5 ccm) ausgewertet:

	Serum 120		Serum 200	
		Resultat		Resultat
0,5 Tox. + 0,1 Serum	Kan. 40	0	Kan. 43	0
0,5 „ + 0,02 „	„ 41	0	„ 44	0
0,5 „ + 0,005 „	„ 42	0	„ 45	0

Die untere Grenze war also bei keinem der beiden Sera erreicht, und es wurden weiter eingestellt:

0,5 Tox. + 0,0025 Serum	Kan. 46	† 1	Kan. 48	† $1^1/_2$
0,5 „ + 0,001 „	„ 47	† 1	„ 49	† $1^1/_2$

Danach wäre die neutralisierende Kraft beider Sera dieselbe gewesen. Die Interpolation des Wertes 0,0035 ergab aber einen Unterschied zugunsten von Serum 200:

0,5 Tox. + 0,0035 Serum	Kan. 50	Lähmung † $10^1/_2$	Kan. 51	0

Durch solche Interpolationen kann man selbstverständlich den Tierverbrauch stark eindämmen; gerade die hohen Kosten sind es ja, welche man immer gegen die Verwendung von Kaninchen zur Eichung der Dysenteriesera ins Treffen führt.

Die Auswertung von Toxin-Antitoxin-Gemischen durch intravenöse Injektion in die Schwanzvenen von weißen Mäusen lehnt *Doerr* ab, und zwar lediglich aus dem Grunde, *weil eben das Kaninchen bessere Resultate liefert*, nicht aber, weil die Titration an Mäusen unmöglich ist. *Doerr* vertritt die berechtigte Ansicht, daß man zur Messung irgendeines Vorganges, z. B. der Toxin-Antitoxin-Reaktion, stets jene Methode zu wählen habe, welche mit den geringsten Fehlerquellen behaftet ist, es wäre denn, daß die Genauigkeit des Meßresultates innerhalb der in Frage kommenden Grenzen und in Anbetracht des Zweckes der Messung als irrelevant bezeichnet werden darf. Letzteren Standpunkt kann man aber bei der Wertbestimmung der Dysenteriesera *vorläufig* nicht einnehmen, solange nicht die systematische Erprobung am Krankenbett in dem bereits erläuterten Sinne dazu autorisiert. Die Kosten des Auswertungsverfahrens fallen nach *Doerr* nur ceteris paribus in die Wagschale, schon deshalb, weil sie den Preis der Heilsera nur wenig beeinflussen und durch Zentralisierung der Auswertungen innerhalb größerer Staaten reduzierbar sind.

Zu der an und für sich etwas ungleichmäßigeren Empfindlichkeit der weißen Mäuse gegen intravenös injiziertes Shigagift gesellen sich noch die Fehlerquellen, welche in der Injektionstechnik begründet sind.

Quantitative intravenöse Injektionen sind bei der Maus zweifellos weit schwieriger als beim Kaninchen, und alle Ungenauigkeiten werden überdies durch das niedrige, noch zulässige Injektionsvolum (0,5 ccm) relativ vergrößert. Injektionsfehler (partiell subcutane Einspritzungen) sind ferner beim Kaninchen mit freiem Auge ohne weiteres sichtbar und dem Experimentator in jedem einzelnen Falle bewußt, nicht aber bei der weißen Maus. Die Deutung von Unregelmäßigkeiten der Auswertungsreihen resp. ihre nachträgliche Zurückführung auf Injektionsfehler ist daher bei Verwendung der letztgenannten Tierspezies meist ebenso naheliegend wie willkürlich.

Es gibt aber ein Mittel, welches die Heranziehung von weißen Mäusen zur Auswertung im Gemischtverfahren erlaubt und sogar eine noch größere Exaktheit verbürgt als die ausschließliche Titration am Kaninchen. Dasselbe besteht darin, daß man zuerst den Neutralisationswert an der Maus möglichst scharf einstellt und diesen Wert an zwei oder drei Kaninchen verifiziert resp. korrigiert. Es ist nämlich fast sicher, daß völlig neutrale Toxin-Serum-Gemenge auf keine der beiden Tierspezies zu wirken vermögen. Schon *Doerr* konstatierte dieses Verhalten bei einem Serum; er fand zwar bei anderen Sera Differenzen zwischen „Kaninchen"-

und „Maus"-Wert, von denen aber anzunehmen ist, daß sie den natürlichen Mängeln der Mäuseauswertung zur Last gelegt werden dürfen. Ganz bestimmt können wir uns allerdings über diesen Punkt nicht aussprechen und begnügen uns daher, ein gut analysiertes Beispiel vorzubringen.

Das Bouillonkulturfiltrat Nr. VII war in der Menge von 0,01 ccm für die weiße Maus, in der Dosis von 0,05 ccm für das Kaninchen sicher letal. Es wurde nun zunächst eine Reihe mit weißen Mäusen angesetzt, von denen jede 0,1 ccm (das zehnfache Multiplum) plus fallenden Dosen eines antitoxischen Serums (Nr. 2000) intravenös erhielt. Bindungszeit eine Stunde bei Zimmertemperatur.

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
310	14	0,1 Toxin + 0,003 Serum	θ
311	14	0,1 „ + 0,0025 „	θ
312	14	0,1 „ + 0,002 „	θ
313	14	0,1 „ + 0,002 „	θ
314	14	0,1 „ + 0,0015 „	θ
315	14	0,1 „ + 0,001 „	† 4
316	14	0,1 „ + 0,001 „	† $1^1/_2$
317	14	0,1 „ + 0,0008 „	† $2^1/_2$
318	14	0,1 „ + 0,0006 „	† $1^1/_2$
319	14	0,1 „ + 0,0004 „	† $1^1/_2$
320	14	0,1 „ + 0,0002 „	† $2^1/_2$
321	14	0,1 „ + 0,0001 „	† 1
322	14 (Kontrolle)	0,1 „	† 3
323	14 „	0,1 „	† 3

Die Reihe war somit sehr gleichmäßig ausgefallen, nur wiesen die Mäuse mit insuffizienten Serummengen durchwegs geringere Todeszeiten auf als die Kontrollen, welche das ganz unbeeinflußte Gift erhalten hatten. War kein Zufall im Spiele, so wurde 0,1 ccm Toxin gerade noch durch 0,0015 ccm Serum neutralisiert, durch 0,001 ccm nicht mehr; 0,5 ccm hätten demnach 0,0075 Serum erfordert. Um dies zu prüfen, injizierten wir bei 5 Kaninchen folgende Gemische:

Nr.	Gewicht in g	Injektionsdosis in ccm	Resultat
805	1650	0,5 Toxin + 0,02 Serum	θ
806	1600	0,5 „ + 0,015 „	θ
807	1700	0,5 „ + 0,01 „	θ
808	1750	0,5 „ + 0,0075 „	θ
809	1550	0,5 „ + 0,005 „	† $1^1/_4$

Die Übereinstimmung war somit ausgezeichnet.

In einem anderen Falle (Serum Gloria C 235) ergab die Titration gegen 0,1 ccm desselben Toxins in drei Mäuseserien drei verschiedene neutralisierende Dosen, nämlich

in Serie I $\leqq$ 0,0005,
„ „ II $>$ 0,001,
„ „ III $<$ 0,001,

wobei die einzelnen Reihen ein durchaus regelmäßiges Bild bei einwandfreien Kontrollen boten. Im Kaninchenversuch wurde 0,5 des Testgiftes durch 0,005 ccm Serum oder durch höhere Dosen, nicht aber durch 0,004 oder niedrigere Mengen abgesättigt; der wahre Wert für 0,1 Gift betrug somit 0,001 ccm Serum.

Mit der für die Wahl eines Maßstabes bedeutsamen Frage, ob eine bestimmte Menge eines gegebenen Serums stets die gleiche Anzahl letaler Dosen absättigt, gleichgültig welches Shigagift man dazu verwendet, oder ob zwischen Toxizität und Neutralisierbarkeit der verschiedenen Giftlösungen keine konstante Beziehung besteht, haben wir uns zu wenig beschäftigt, um eine Aussage wagen zu können. Wenn die Angabe von *Fukuhara* richtig sein sollte, daß das Dysenterietoxin direkt in atoxische, kein Antitoxin bindende Derivate (beim Altern etc.) umgesetzt wird, müßte sich die Angelegenheit im erstgenannten Sinne entscheiden lassen, und man könnte den Wert eines Serums einfach durch die Anzahl letaler Dosen, welche ein Kubikzentimeter neutralisiert, ausdrücken. Soweit unsere Beobachtungen reichen, scheinen die Mengen eines bestimmten antitoxischen Serums, welche eine letale Dosis verschiedener Gifte neutralisieren, nicht sehr weit auseinanderzuliegen; identisch waren sie jedoch nicht. Von Serum 2000 z. B. erforderten:

10 letale Dosen	Filtrat VII enthalten in 0,1 ccm	0,0015 ccm	Serum.
10 „ „	Natriumsulfattoxin	0,001 „	„
10 „ „	Filtrat III enthalten in 1,5 ccm	0,0028 „	„

so daß also der Gehalt an unverändertem Toxin (gemessen an der Giftigkeit für weiße Mäuse!) doch nicht ganz allein den Ausschlag zu geben scheint.

IV. Getrenntwerte.

In der Diskussion über dieses Thema hat man zwei Dinge auseinanderzuhalten: das Prinzip des vom Neutralisationswert verschiedenen Heilwertes und seine praktische Anwendung auf die Wertbestimmung der Dysenteriesera. Das Prinzip besagt, daß für den therapeutischen Effekt nicht so sehr die Menge des Antitoxins in die Wagschale fällt, sondern die von der Menge bis zu einem gewissen Grade unabhängige *Avidität zum Toxin*, welche die Reaktionsgeschwindigkeit und die Möglichkeit bestimmt, bereits an die Gewebe verankertes Gift unschädlich zu machen. (*Kraus* und seine *Mitarbeiter*, *Roux*, *Tizzoni*, *Barikin*, *P. Th. Müller* u. a. m.) Es ist ohne weiteres klar, daß die *Ehrlich*sche Prüfungsmethodik (Bestimmung der Gemischwerte) nur über die Menge des Antitoxins Aufschluß zu geben vermag, speziell wenn man — wie das ja geschieht — den Kontakt von Gift und Serum in vitro so lange andauern läßt, bis sich beide Reaktionskomponenten zu einer im Organismus nicht mehr dissoziierbaren Verbindung fest vereint haben. Könnte

daher am Krankenbett der Nachweis erbracht werden, daß „avidere" Sera tatsächlich mehr leisten, und daß die Antitoxinmenge innerhalb weiter Grenzen gleichgültig ist, so stünde man zweifellos vor der Notwendigkeit, neue Meßmethoden für den als wichtig erkannten Faktor, die Avidität, einzuführen.

Von dieser prinzipiellen Seite der Angelegenheit, die hier nicht erörtert werden soll, muß die *prüfungstechnische* Frage abgetrennt werden, ob das von *Kraus* und *Doerr* seinerzeit in Anregung gebrachte und im Wiener Serotherapeutischen Institut eingeführte Verfahren der Bestimmung der Getrenntwerte *regelmäßige, reproduzierbare Resultate* liefert, und ob es seiner ganzen Natur nach etwas über den „Heilwert" der Sera im Sinne von *Kraus* aussagt.

Přibram und *Halle* definieren neuerdings (1917) den Vorgang der getrennten Auswertung als die „getrennte Injektion von Dysenterietoxin und Dysenterieantitoxin in die Ohrvenen eines Kaninchens, wobei die Menge von 0,1—0,2 ccm Serum die tödliche Dosis neutralisieren soll". Das ist jedoch eine ungenaue Formulierung. Abgesehen davon, daß die Reihenfolge (Toxin-Antitoxin oder Antitoxin-Toxin) nicht angegeben wird, fehlt auch eine Norm über die Länge des Intervalles. Man darf wohl — dem Sinne eines „*kurativen*" Versuches entsprechend — annehmen, daß das Gift zuerst in die Blutbahn gespritzt werden soll und nicht das Serum, zwei Möglichkeiten, die selbstverständlich zu ganz verschiedenen Ergebnissen führen. Aber damit ist eben noch nichts über das Intervall ausgesagt. *Kraus* und *Doerr* sprachen in den ersten Publikationen von getrennter, *gleichzeitiger* Injektion; in praxi wird aber nicht gleichzeitig, sondern sukzedan eingespritzt, und da spielt die Dauer der Zwischenzeit eine große Rolle. *Doerr* vermochte zu zeigen, daß bei 90 Sekunden Intervall schon 600 mal mehr Serum erforderlich ist, um Kaninchen gegen die $2^1/_2$fach letale Dosis zu schützen, als in vitro zur Neutralisation der gleichen Giftmenge nötig wäre; er schließt aus dieser Differenz, daß das Toxin sehr rasch von den giftempfindlichen Geweben gebunden wird, und daß daher die *Länge des Zeitraumes zwischen Gift- und Seruminjektion* und die *absolute Größe des einverleibten Toxinquantums* einen ganz entscheidenden Einfluß auf den Ausfall der Versuche ausüben müssen. Das absolute Toxinquantum spielt insofern eine Rolle, als von einer größeren Menge in derselben Zeit leichter eine letale Dosis an die empfindlichen Gewebe abgegeben wird als von einer geringeren; der Vorgang der Bindung an die Zellen ist ja höchstwahrscheinlich eine Funktion des „Konzentrationsgefälles". Erhöht man daher bei konstantem Intervall zwischen Gift- und Serumzufuhr die Giftmenge auf das 2-, 3-, 4fache, so läßt sich das durch eine entsprechende Steigerung der Serumgaben nicht wettmachen. Diese Überlegungen konnte *Doerr* durch entsprechende Versuchsanordnungen verifizieren.

Weiter stellte sich heraus, daß *regelmäßige* und *reproduzierbare Resultate* selbst bei Einhaltung eines ganz bestimmten Zeitintervalles *nicht zu erhalten sind*, speziell wenn man höhere Multipla der einfach letalen Dosis anwendet; ein gleichmäßigeres Gepräge nehmen die Auswertungsreihen erst an, wenn man mit dem Intervall auf wenige Sekunden (12—15) und mit der Giftmenge auf die einfache oder doppelt letale hinuntergeht. Nach *Doerr* heißt das aber nichts anderes, als daß die Bestimmung der Getrenntwerte erst unter Voraussetzungen durchführbar wird, die eine Absättigung des noch in der Blutbahn kreisenden Toxins erlauben und mit dem „Heilwert" im Sinne von *Kraus* nichts zu schaffen haben.

Vielleicht würde sich indes die ganze Sachlage anders gestalten, wenn man ein Tier fände, bei welchem die Bindung des Toxins an die Gewebe und vielleicht auch die Aktion des bereits verankerten Giftes auf die Zellen wesentlich langsamer verläuft als beim Kaninchen. Wir hatten Grund zu der Annahme, daß solche Verhältnisse bei der weißen Maus vorliegen könnten. In der Tat berichteten *Kolle*, *Heller* und *de Mestral*, es sei ihnen gelungen, weiße Mäuse noch 6 Stunden nach der intraperitonealen Injektion der 4fachen Dosis certe letalis am Leben zu erhalten, wenn sie ihnen eine genügende Quantität Serum gleichfalls intraperitoneal nachinjizierten. Die Autoren fügen hinzu, daß in diesen Versuchen die Sera nach Maßgabe ihres durch die Methode der Mischwerte ermittelten Gehaltes an Antitoxin wirkten. Aus den Protokollen lassen sich für letztere Angabe jedoch keine Anhaltspunkte gewinnen, indem ein und dasselbe Serum selbst bei einem Intervall von nur 15 Min. in niedrigen Dosen (0,01—0,05 ccm) zu schützen vermochte, in großen Mengen (0,3—0,5 ccm) dagegen ab und zu versagte.

Es lag aber nahe, die intravenöse Technik zur Klarstellung der Verhältnisse bei der Maus zu benützen und dadurch den Einfluß der Resorption von Gift und Antitoxin auf die Ergebnisse auszuschalten. Die Ausführung der Doppelinjektionen bereitete meiner Mitarbeiterin (Frl. *B. M. Herzog*) keine Schwierigkeiten.

Als Gift diente Filtrat VII, als Serum Nr. 2000, die beide bereits sehr sorgfältig untersucht worden waren. Von Toxin VII betrug die zehnfache Dosis certe letalis 0,1 ccm und wurde durch 0,0015 ccm Serum 2000 in vitro glatt neutralisiert. Die Dosis letalis für Kaninchen belief sich auf 0,05 ccm Toxin VII in vitro; der Neutralisationswert des Serums war der gleiche wie für weiße Mäuse.

Getrenntwerte für Kaninchen:

a) 0,5 ccm Toxin in die rechte Ohrvene, **30 Sek.** später fallende Mengen Serum 2000 in die linke Ohrvene:

Gewicht in g	Injektionsdosis (Serum) in ccm	Resultat
900	0,5	† $1^1/_2$
901	0,25	θ
902	0,1	† $1^1/_2$
903	0,05	† $1^1/_2$
904	0,025	† $1^1/_2$

b) wie a), nur längeres Intervall **(60 Sek.)**:

905	0,5	† $2^1/_2$
906	0,25	† $^3/_4$
907	0,1	† 1
908	0,05	† 1
909	0,05	† $2^1/_2$
910	0,025	Lähmung, erholt sich.

c) wie a), nur geändertes Intervall **(120 Sek.)**:

911	0,5	† $1^1/_2$
912	0,25	† $1^1/_2$
913	0,1	† $^3/_4$
914	0,05	† $^3/_4$
915	0,025	† 1

Getrenntwerte für weiße Mäuse:

a) 0,1 ccm Toxin in eine Schwanzvene, ca. **30 Sek.** später fallende Dosen Serum 2000 intravenös:

Gewicht in g	Injektionsdosis (Serum) in ccm	Resultat
330	0,05	θ
331	0,04	θ
332	0,03	† 1
333	0,03	θ
334	0,02	θ
335	0,02	θ
336	0,015	θ
337	0,015	θ
338	0,01	Lähmung, erholt sich.
339	0,005	† $1^1/_2$
340	0,002	† $1^1/_2$
341	0,002	† 3
342 (Kontr. ohne Ser.)	—	† $2^1/_2$
343 („ „ „)	—	† $2^1/_2$

b) wie a), Intervall **10—12 Min.**:

344	0,3	θ
345	0,2	† $1^1/$
346	0,1	† $1^1/_2$
447	0,075	θ
348	0,05	θ
349	0,04	† $3^1/_2$
350	0,03	θ
351	0,02	θ
352	0,01	θ
353	0,005	† 2
354 (Kontrolle)	—	† $2^1/_4$
355 („)	—	† $2^1/_4$

c) Intervall: **30 Min.:**

Gewicht in g	Injektionsdosis (Serum) in ccm	Resultat
356	0,5	Lähmung, erholt sich.
357	0,3	θ
358	0,2	θ
359	0,1	θ
360	0,075	† $4^1/_2$
361	0,05	θ
362	0,04	θ
363	0,03	Lähmung, erholt sich.
364	0,02	θ
365	0,01	θ
366	0,005	Lähmung, erholt sich.
367	0,0025	† $3^1/_2$
368 (Kontrolle)	—	† 2
369 („)	—	† $2^1/_2$

d) Intervall **2 Stunden:**

370	0,5	† $1^1/_2$
371	0,3	† 7
372	0,2	† $9^1/_2$
373	0,1	θ
374	0,05	θ
375	0,025	† $2^1/_2$
376	0,01	† 2
377	0,0075	† 5
378	0,005	θ
379 (Kontrolle)	—	† $1^1/_2$
380 („)	—	† $1^1/_2$

e) Intervall **6 Stunden:**

381	0,5	θ
382	0,3	θ
383	0,2	θ
384	0,1	† $3^1/_2$
385	0,05	† 4
386	0,025	† $2^1/_2$
387	0,01	θ
388 (Kontrolle)	—	† $1^1/_2$

Das gegensätzliche Verhalten von Kaninchen und Mäusen erscheint somit sehr deutlich ausgeprägt. Die ersteren konnten selbst durch die 67fache Menge der in vitro neutralisierenden Serumdosis (0,0075 ccm) nicht mehr gerettet werden, wenn man nach der endovenösen Injektion der 10fach letalen Toxindosis 30—120 Sekunden verstreichen ließ. Mäuse dagegen blieben am Leben, auch wenn das Intervall zwischen Gift- und Seruminjektion *auf 6 Stunden* anwuchs, wobei noch zu bedenken ist, daß durch die Verteilung der 10fach letalen Toxindosis im Gesamtblut der Maus eine weit höhere Giftkonzentration resultieren muß als

durch die Vermischung mit dem Blute des Kaninchens. Die mit der getrennten Injektion von Gift und Serum bei Mäusen erzielbaren Reihen waren — solange das Intervall 30 Minuten nicht überschritt — relativ gleichmäßig; die wenigen Unregelmäßigkeiten, die man zu Gesicht bekam, trifft man ebenso auch in Serien, welche mit Toxin-Antitoxin-Gemischen ausgeführt werden, oder bei der direkten Ermittelung der letalen Toxindosis durch intravenöse Einspritzung fallender Giftmengen. Innerhalb des genannten Bereiches stieg auch die für die „Neutralisation in vivo" nötige minimale Serumdosis nicht an und war insofern niedrig, als sie die in vitro neutralisierende Serumquantität (0,0015 ccm) nur um das 3—6fache (0,005—0,01 ccm) übertraf.

Erst nach 2 Stunden häuften sich die Unregelmäßigkeiten stärker, und gleichzeitig erhob sich auch die neutralisierende Dosis auf 0,05 (Intervall 2 Stunden) resp. auf 0,2 ccm (6 Stunden Intervall); allerdings blieb ab und zu eine Maus mit einer kleinen Serummenge (Nr. 378 und 387) am Leben, wobei es unentschieden gelassen werden mußte, ob das betreffende Tier als „*Toxin-Versager*" zu betrachten war, oder ob bei ihm infolge konstitutioneller oder konditioneller Faktoren die Verankerung des Giftes an die Gewebe noch langsamer als de norma vor sich ging.

Um zu erfahren, ob und in welchem Ausmaße *spezielle Eigenschaften der Gifte oder der Sera* die Resultate der Getrenntinjektionen bei der weißen Maus beeinflussen können, wurden andere Toxinlösungen und andere Sera mit der gleichen Versuchsanordnung geprüft. Es erscheint ja nicht ausgeschlossen, daß verschiedene Dysenterietoxine vom Gewebe verschieden leicht und schnell gebunden werden; selbst wenn das Toxin der Shigastämme ein einheitlicher Körper sein sollte, könnte es durch Adsorption an kolloide Stoffe der Bouillonkulturfiltrate seine Reaktivität innerhalb weiter Grenzen ändern. Für die Sera andererseits ist es a priori sicher, daß der in vivo neutralisierende Wert irgendwie vom Antitoxin abhängen muß, entweder von seiner „*Menge*" oder von seiner „*Avidität*" zum Toxin, oder daß er eine komplizierte Funktion *beider* Variablen darstellt.

Zunächst wurde daher das Toxin vertauscht und das *Natriumsulfatgift* gewählt, von dem man am ehesten denken konnte, daß es sich von den Bouillonkulturfiltraten unterscheiden würde. Zudem besaß das Trockengift (in Form der vorgeschriebenen Lösung) dieselbe Maustoxizität wie Filtrat VII (Dosis certe letalis 0,01 ccm), so daß in diesem Belange eine wenigstens äußerliche (volumetrische) Gleichheit der sonstigen Versuchsbedingungen zu erzielen war. Das Serum wurde beibehalten (2000).

Im Gemischtversuch verhielten sich Serum 2000 und das Trockentoxin (10fach letale Dosis) wie folgt:

Nr.	Injektionsdosis in ccm	Resultat
400	0,1 Toxin Na + 0,003 Serum 2000	0
401	0,1 „ „ + 0,0025 „ 2000	0
402	0,1 „ „ + 0,002 „ 2000	0
403	0,1 „ „ + 0,002 „ 2000	0
404	0,1 „ „ + 0,0015 „ 2000	0
405	0,1 „ „ + 0,0015 „ 2000	0
406	0,1 „ „ + 0,001 „ 2000	0
407	0,1 „ „ + 0,001 „ 2000	0
408	0,1 „ „ + 0,0008 „ 2000	† $2^1/_2$
409	0,1 „ „ + 0,0006 „ 2000	† $1^1/_2$
410	0,1 „ „ + 0,0003 „ 2000	† $^3/_4$
411	0,1 „ „ + 0,0002 „ 2000	† 6
412 (Kontrolle)	0,1 „ „	† $^3/_4$
413 („)	0,1 „ „	† $^3/_4$

Die Getrenntinjektionen ergaben:

a) mit einem Intervall von **30 Minuten** (0,1 Toxin):

Nr.	Injektionsdosis in ccm	Resultat
414	0,3	0
415	0,2	0
416	0,1	0
417	0,05	0
418	0,025	† $8^1/_2$
419	0,01	0
420	0,005	† 2
421	0,0025	† $1^1/_2$
422	0,001	† $2^1/_2$
423 (Kontrolle)	0,1 Toxin Na	† $2^1/_2$
424 („)	0,1 „ „	† 3

b) mit einem Intervall von **2 Stunden:**

425	0,5	0
426	0,4	† $^3/_4$
427	0,3	0
428	0,2	0
429	0,1	† 1
430	0,05	† $5^1/_2$
431	0,025	† $1^1/_2$
432	0,01	† 3
433	0,0075	† 3
434	0,005	† 3
435 (Kontrolle)	0,1 Toxin Na	† $2^1/_2$
436 („)	0,1 „ „	† $1^1/_4$

Das Natriumsulfattrockentoxin folgte also bei der Neutralisation in vivo durch Serum 2000 einem ähnlichen Gesetze wie das Bouillonkulturfiltrat VII.

Von Sera waren wir leider nur in der Lage, zwei Proben zu prüfen, und zwar

Serum Gloria C 235 und Serum Gisela,

die uns beide das Schweizerische Seruminstitut in Bern in zuvorkommendster Weise zur Verfügung gestellt hatte.

Von Serum Gloria C 235 neutralisierte 0,001 ccm in vitro die zehnfach letale Dosis von Filtrat VII; von Serum Gisela war doppelt soviel (0,002 ccm) erforderlich. Im Getrenntversuch verhielten sich die Sera sehr verschieden; das Intervall betrug bei „Gloria" in einer Serie 10, in der anderen 30 Minuten, mit Serum „Gisela" konnte leider nur eine einzige Reihe angesetzt werden.

Getrenntwerte von Serum „Gloria":

α) 0,1 Toxin VII, nach 10 Minuten fallende Serumdosen, beides intravenös an weißen Mäusen:

Nr.	Injektionsdosis in ccm	Resultat
440	0,3	θ
441	0,2	θ
442	0,1	θ
443	0,05	† 2
444	0,02	θ
445	0,01	† 1
446	0,005	θ
447	0,0025	† 1
448	0,001	† 2
178 (Kontrolle)	0,1 Toxin VII	† $1^1/_2$
179 („)	0,1 „ „	θ

β) wie α, nur mit Intervall von **30 Minuten:**

449	0,5	θ
450	0,3	θ
451	0,1	† 3
452	0,05	θ
453	0,03	θ
454	0,02	† 6
455	0,01	† 8
456	0,0075	† 4
457	0,005	† 10
458	0,0025	† 4
459 (Kontrolle)	0,1 Toxin	† 3
460 („)	0,1 „	† 3

Getrenntwerte von Serum „Gisela"; Intervall **30 Minuten:**

461	0,3	θ (leichte Lähmung)
462	0,2	† $2^3/_4$
463	0,1	† 1
464	0,05	† $2^3/_4$
465	0,03	† $^3/_4$
466	0,02	† 2
467	0,01	† 1
468	0,0075	† 2
469	0,005	† 2
470	0,0025	† $1^3/_4$
471	0,001	† $2^1/_2$
472 (Kontrolle)	0,1 Toxin	† $1^1/_4$
473 („)	0,1 „	† 2
474 („)	0,1 „	† 2

Das Serum „Gloria" entsprach also hinsichtlich seines Neutralisierungsvermögens in vivo dem Serum 2000, konform der Tatsache, daß auch die in vitro nachweisbaren toxinbindenden Eigenschaften beider Sera nur wenig voneinander abwichen. Serum „Gisela" dagegen schützte im Getrenntversuch auffallend wenig, obwohl sein Antitoxingehalt — wie er sich durch die Mischmethode feststellen ließ — nicht so erheblich von dem des Gloriaserums oder gar des Serums 2000 differierte (0,002 gegen 0,001 resp. 0,0015). Aus dieser isolierten Beobachtung wollen wir indes keine weitergehenden Schlüsse ableiten; unsere, hier nur zum Teil niedergelegten Erfahrungen warnen geradezu davor, eine einzige, wenn auch vielgliedrige und gleichmäßige Auswertungsreihe an weißen Mäusen für unbedingt zuverlässig zu halten. Immerhin aber darf man sagen, daß die Experimente mit getrennter intravenöser Injektion von Gift und Serum an Mäusen zu einer Wiederaufnahme der von *Kraus* und *Doerr* inaugurierten Arbeitsrichtung ermuntern, da die Einführung eines *für diesen Zweck* sehr geeigneten Versuchstieres eine generelle Entscheidung über die strittige Existenz einer von der Antitoxinmenge unabhängigen Antitoxinqualität erhoffen läßt.

Selbst wenn die Entscheidung für das Dysenterieantitoxin in positivem Sinne fallen sollte, würde die Deutung der neutralisierenden Kraft in vivo als Funktion der „Avidität" resp. Reaktionsgeschwindigkeit zunächst zweifelhaft bleiben. Weiter würde sich daraus — wie schon in anderem Zusammenhange angedeutet — keineswegs automatisch die Konsequenz der Auswertung der Dysenteriesera im Getrenntversuch an Mäusen ergeben. Es wurde im vorstehenden gezeigt, wie verschieden sich zwei gegen Shigatoxin empfindliche Tierspezies gegen die getrennte Injektion von Gift und Serum verhalten; ob der Mensch dem „Kaninchen"- oder dem „Mäuse-Typ" näher steht, oder ob er einen besonderen Reaktionsmodus repräsentiert, wissen wir nicht und verlieren damit natürlich die Berechtigung, eine eventuelle, nur an der Maus nachweisbare Serumqualität zur dauernden Grundlage der Beurteilung des therapeutischen Wertes antitoxischer Dysenteriesera zu machen. Diese Berechtigung erwüchse erst aus der sichergestellten Erfahrung, daß sich die im Getrenntversuch an der Maus hochwertigen Sera beim ruhrkranken Menschen besser bewähren.

Schlußfolgerungen.

1. Es wird in Anlehnung an *Doerr* auseinandergesetzt, daß der sicherste Weg, welcher derzeit eingeschlagen werden kann, um über die strittige Leistungsfähigkeit der Serotherapie der bacillären Ruhr Klarheit zu gewinnen, darin besteht, daß man unter besonderen Bedingungen Ruhrfälle mit monovalenten homologen Sera behandelt. Erst auf Grund solcher (nicht in genügender Menge vorhandener), durch entsprechende

Kontrollen gesicherter Erfahrungen kann an eine wissenschaftliche Regelung der durch die Anforderungen der Praxis aufgeworfenen Frage der polyvalenten Sera herangetreten werden.

2. Die für die gedachte klinische Erprobung bestimmten monovalenten Sera müssen ihren Eigenschaften nach bekannt, d. h. nach allgemein akzeptierten Methoden ausgewertet sein. Dann und nur dann wird die Erprobung Aufschlüsse über die am Zustandekommen des therapeutischen Effektes beteiligten Serumqualitäten geben und die Auslese der für den Kliniker wichtigen, aus der großen Zahl der serologisch möglichen Verfahren der Wertbemessung der Sera gestatten.

3. Zurzeit herrscht nicht nur Uneinigkeit hinsichtlich der Serumwirkungen, auf denen der Heilwert der Dysenteriesera beruht, sondern es existieren nicht einmal allgemein anerkannte Methoden, um irgendeine dieser Wirkungen dem Grade nach zu bestimmen.

4. In diesem Stadium befindet sich auch die *Titration der Antitoxine*, d. h. der die Gifte der Shigabacillen neutralisierenden Antikörper. Die vorliegenden Untersuchungen befassen sich mit den Vorarbeiten, welche erledigt werden müssen, um hier zu einer *provisorischen (und falls die Antitoxine den Heilwert ausmachen, auch zu einer definitiven)* Festlegung einer Standard-Meßmethode zu gelangen.

5. Das Shiga-Toxin scheint ein einheitlicher Körper zu sein. Die Zerlegung in mehrere Partialgifte (*Fukuhara*, *Horimi* und *Ando*, *Olitsky* und *Kligler*, *Thjøtta* und *Sundt*) ist vorderhand nicht ausreichend begründet.

6. Kaninchen reagieren auf die intravenöse Injektion dieses Giftstoffes *gleichmäßig*. Die Ermittelung einer *Dosis certe letalis* macht keine Schwierigkeiten, weit eher die der *Dosis letalis minima*; erstere eignet sich als Einheit zur Messung der Toxizität, letztere nicht. Eine Einbeziehung der „*Todeszeit*" in die Definition der Dosis letalis ist beim Dysenterietoxin unmöglich, da dieser Faktor kein gesetzmäßiges Verhalten zeigt.

7. Das im Punkt 6 Gesagte gilt auch für die intravenös injizierte weiße Maus. Nur sind die Auswertungsreihen bei direkten Gifttitrationen doch weniger regelmäßig, und es kommt insbesondere vor, daß einzelne Mäuse auf relativ hohe Giftdosen aus unbekannten Gründen gar nicht reagieren; beim Kaninchen konnten solche „Toxinversager" trotz der sehr großen Zahl von Einzel- und Reihenversuchen nie beobachtet werden.

8. Die *durchschnittliche* wie auch die *minimale Todeszeit* ist bei der weißen Maus etwa 3—4 mal so lang wie beim Kaninchen. Es beruht diese Differenz entweder auf einer langsameren Bindung des Toxins an die Gewebe oder auf einer nur allmählich vor sich gehenden Wirkung des bereits gebundenen Giftes auf das Zellprotoplasma.

9. Auf das Gramm Körpergewicht berechnet ist die Maus ca. 10- bis 30 mal weniger empfindlich als das Kaninchen. Absolut konstant ist das Verhältnis der Maus- zur Kaninchentoxizität nicht; doch bedeutet das noch keinen Einwand gegen die einheitliche Natur des Shigatoxins. Für das stärkste der geprüften Gifte betrug die Dosis certe letalis 0,00003 ccm pro g Kaninchen und 0,00066 pro g Maus.

10. Zwischen Kulturbouillonfiltraten und Natriumsulfattrockentoxin bestand hinsichtlich der Organotropien (Wirkung auf den Darm und auf das Nervensystem) trotz der verschiedenen Herstellungsart kein Unterschied. Auch die Neutralisierbarkeit durch antitoxische Sera war die gleiche; diese Erfahrungen sprechen gegen die Abtrennung eines „Exotoxins" von einem „Endotoxin" und gegen die Annahme, daß jeder dieser beiden hypothetischen Giftarten besondere Antitoxine zugehören (*Olitsky* und *Kligler*).

11. Von vier untersuchten Bouillonkulturfiltraten behielten zwei ihre Giftigkeit bei einjähriger Konservierung unter Toluol unverändert bei, eines zeigte vielleicht eine geringe Abschwächung; nur beim vierten war die Toxizität auf $^1/_5$ ihres ursprünglichen Wertes gesunken, doch konnte gerade hier eine akzidentelle Verunreinigung die Schuld tragen.

12. Die Auswertung antitoxischer Sera durch intravenöse Injektion von Gift-Serum-Gemischen ist ebenso am Kaninchen wie an der weißen Maus möglich[1]). Regelmäßiger, reproduzierbarer und nachträglicher Interpolation besser zugänglich sind die Reihen beim Kaninchen. Abgesehen von der etwas weniger gleichmäßigen Giftempfindlichkeit der Maus tragen die natürlichen Fehlerquellen der intravenösen Injektionstechnik bei diesem Versuchstier die Schuld. Besonders exakte Resultate (bei gleichzeitiger Verminderung der Ausgaben für Versuchstiere) erzielt man, wenn man das Serum an Mäusen „grob" einstellt und den gefundenen Annäherungswert mit Hilfe des gleichen Testgiftes an Kaninchen korrigiert.

13. Die *Methode der getrennten Injektion von Gift und Serum beim Kaninchen* (*Kraus* und *Doerr*) liefert je nach der Größe der Giftdosis und der Länge des zwischen beide Injektionen eingeschalteten Intervalles sehr verschiedene Resultate; je höher die Giftmenge und je länger das Intervall (wobei Differenzen von *Sekunden* bereits eine Rolle spielen), desto unregelmäßiger wird der Versuchsausfall. Um auch nur einigermaßen gleichmäßige Ergebnisse zu erhalten, muß man mit der Giftmenge an die einfach letale Dosis herangehen und die Zwischenzeit auf wenige Sekunden abkürzen, d. h. Bedingungen schaffen, unter welchen

[1]) In diesem Sinne äußert sich auch *Fukuhara* (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **35**. 1923).

noch eine Neutralisation von nicht gebundenem, im Blute zirkulierendem Gift möglich ist.

14. Die weiße Maus dagegen wird durch eine nachfolgende Seruminjektion gegen die 10fach letale Giftdosis geschützt, selbst wenn man das Intervall bis auf 6 Stunden verlängert. Die schützenden Serummengen sind bis zu einer Intervalldauer von 30 Minuten klein, betragen nur das 3—6fache der zur Neutralisation des Giftes in vitro nötigen Serumquantität und bleiben in dem genannten Bereiche konstant. Wächst das Intervall über diesen Termin hinaus (2—6 Stunden), so erhöhen sich nunmehr auch die zur Rettung der Tiere erforderlichen Serumdosen. Diese Erscheinungen ändern sich nicht, wenn man statt eines Bouillonkulturfiltrates ein Natriumsulfattrockentoxin verwendet.

15. Ob die im Getrenntversuch an der weißen Maus zu ermittelnden Serumwerte zur Antitoxinmenge, d. h. zu den Neutralisationswerten in vitro in einer konstanten Beziehung stehen oder ob sie von einer besonderen Eigenschaft der Sera (Antitoxine) abhängen, welche sich im Gemischtversuch gar nicht ermitteln läßt, konnte bisher noch nicht mit Sicherheit konstatiert werden. Die vorliegenden Resultate berechtigen jedoch dazu, die von *Kraus* und *Doerr* beim Dysenterieserum eingeschlagene Richtung unter Verwendung eines tauglichen Versuchsobjektes (der weißen Maus) weiter zu verfolgen.

Literaturverzeichnis.

Bächer und *Laub*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **4**, 124. 1910. — *Balteano*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, 931. 1922. — *Doerr*, Das Dysenterietoxin. Jena 1907. — *Doerr*, Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung. 1. Bd. 1907. — *Doerr*, Ebenda 2. Bd. 1908. — *Doerr*, Ebenda, 1. Ergänzungsband 1910. — *Doerr*, Berichte der 2. internationalen, vom Hygienecomité des Völkerbundes veranstalteten serologischen Konferenz in Paris 1922 (im Druck). — *Dopter*, *Dumas* und *Combiesco*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, 1140. 1922. — *Dumas* und *Combiesco*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, 942. 1922. — *Ernst*, Dtsch. med. Wochenschr. 1914, S. 1880. — *Falta* und *Kohn*, Wien. klin. Wochenschr. 1915, S. 583. — *Flexner*, *S.* und *H. Amoss*, Journ. of exp. med. **21**, 515. 1915. — *Fukuhara*, *Y.*, Journ. of immunol. **4**. 1919. — *Fukuhara*, *Y.*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **35**, 482. 1923. — *Inomata*, zitiert nach *Fukuhara*. — *Kolle*, *Heller* und *de Mestral*, Arb. a. d. Inst. z. Erforsch. d. Infektionskrankh. in Bern 1908, Heft 1. — *Kolle*, *Heller* und *de Mestral*, Dtsch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 19. — *Kolle* und *Hetsch*, Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten. Berlin 1922, 6. Aufl. — *Kraus* und *Doerr*, Wien. klin. Wochenschr. 1905, Nr. 42. — *Kraus* und *Doerr*, ebenda 1905, Nr. 42. — *Kraus* und *Doerr*, ebenda 1905, Nr. 7. — *Kraus* und *Doerr*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **55**. 1906. — *Kraus* und *Doerr*, Dtsch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 27. — *Lentz*, *O.*, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 2. Aufl., 3. Bd., S. 899. 1913. — *Nicolle*, *Debains* und *Loiseau*, Ann. de l'inst. Pasteur **30**, Nr. 8. 1916. — *Olitsky* und *Kligler*, Journ. of. exp. med. **31**, 19.

1920. — *Pfeiffer* und *Ungermann*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **50**, 534. 1909. — *Přibram, E.*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **80**, 33. 1918. — *Přibram* und *Halle, Weichardts* Ergebn. d. Hygiene, Bakt. usw. **2**, 338. 1917. — *Richet, fils*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, 946. 1922. — *Robertson, R. C.*, Brit. med. journ. 1922, 3225. — *Sachs*, Veröff. a. d. Geb. d. Medizinalverwalt. **7**, Heft 11. 1918. — *Sachs* und *Georgi*, Med. Klinik 1918, S. 610. — *Salimbeni*, Ann. de l'inst. Pasteur **27**, 122. 1913. — *Schottelius*, Med. Klinik 1908, Nr. 32. — *Singer*, Med. Klinik 1914. — *Singer*, Wien. klin. Wochenschr. 1915, S. 381. — *Singer*, Münch. med. Wochenschr. 1915, S. 183. — *Singer*, Wien. med. Wochenschr. 1915, Nr. 6. — *Sonne, C.*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. Abt. I, Orig. **75**, 408. 1915. — *Sordelli*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **83**, 1245. 1920. — *Thjøtta, C.*, Journ. of bacteriol. **4**, 355. 1919. — *Thjøtta, Th.* und *F. Sundt*, Journ. of bacteriol. **6**, 501. 1921.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem verehrten Lehrer Herrn Professor *R. Doerr* für freundlichen Rat und Hilfe und für das große Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte, meinen herzlichen Dank auszusprechen